

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I-Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor Prof. Dr. med. Gerhard Steinbeck

Die Wirkung der Dipeptidylpeptidase IV (CD26) auf Homing
und G-CSF-abhängige Mobilisation von Stammzellen nach
chirurgisch induziertem Myokardinfarkt am Mausmodell

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

Ursula A. Mehl

aus

München

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang-Michael Franz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Nikolaus Plesnila
Prof. Dr. Christian Hagl
Prof. Dr. Andreas Dendorfer
Prof. Dr. Christian Weber

Mitbetreuung durch den promovierten

Mitarbeiter: Dr. med. Marc-Michael Zaruba

Dekan der medizinischen Fakultät: Prof. Dr. med. Dr. h.c M. Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.2012

meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.EINLEITUNG.....	8
<u>1.1. Myokardinfarkt.....</u>	<u>8</u>
1.1.1. Epidemiologie.....	8
1.1.2. Pathophysiologie.....	8
<u>1.2. Stammzelltherapie bei Myokardinfarkt.....</u>	<u>10</u>
1.2.1. Embryonale Stammzellen.....	10
1.2.2. Adulte Stammzellen.....	12
1.2.3. Stammzelltransplantation.....	13
1.2.4. Stammzellmobilisation.....	15
1.2.4.1. G-CSF.....	16
1.2.4.2. Klinische Studien mit G-CSF.....	17
1.2.5. Stammzellhoming.....	18
<u>1.3. Dipeptidylpeptidase IV/ CD26.....</u>	<u>19</u>
1.3.1. Vorkommen.....	19
1.3.2. Struktur.....	20
1.3.2.1 Tertiärstruktur.....	20
1.3.2.2. Kristallstruktur.....	21
1.3.3. Inhibitoren.....	22

1.3.4. Substratspezifität.....	23
1.3.5. Proteaseaktivität.....	24
1.3.6. Zelladhäsionsmechanismen.....	26
1.3.7. Funktion bei Immunprozessen,HIV.....	27
1.3.8. CD26 und Diabetes.....	28
<u>1.4. CD26-abhängige Mechanismen von Stammzellhoming und Stammzellmobilisation.....</u>	<u>29</u>
1.4.1.Interaktion von CD26 mit SDF-1/CXCR4 - Stammzellhoming.....	29
1.4.2. Interaktion von CD26 mit G-CSF – Stammzellmobilisation.....	31
<u>1.5. Fragestellung der Arbeit.....</u>	<u>33</u>
 2. MATERIAL UND METHODEN.....	34
<u>2.1. Material und Geräte.....</u>	<u>34</u>
2.1.1. Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel.....	34
2.1.2. Allgemeine Laborgeräte.....	34
2.1.3. Spezielle Materialien.....	35
2.1.3.1. Operationszubehör.....	35
2.1.3.2. Hämodynamik.....	36
2.1.3.3. Durchflusszytometrie	36
2.1.3.3.1. Materialien.....	36
2.1.3.3.2. Antikörper.....	37
2.1.3.4. Histologie.....	38

2.1.4. Pharmaka.....	38
2.1.5. Hard- und Software.....	39
2.1.6. Versuchstiere, Tierhaltung und Tierversuchsanträge.....	40
<u>2.2. Methoden</u>	41
2.2.1. Versuchsaufbau.....	41
2.2.2. Mausmodell.....	42
2.2.2.1. Infarktinduzierung.....	42
2.2.2.2. Gabe von G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor) und BrdU (Bromodeoxyuridin).....	45
2.2.2.3. Hämodynamische Messungen mittels Herzkatheter.....	46
2.2.2.3.1. Grundprinzip der <i>Conductance Methode</i>	46
2.2.2.3.2. Vena-cava-Okklusion.....	48
2.2.2.3.3. Ablauf der Messung.....	49
2.2.2.3.4. Aufzeichnung und Messparameter.....	51
2.2.3. Histologie.....	52
2.2.3.1. Herstellung der Paraffinschnitte.....	52
2.2.3.2. Bestimmung der Morphologie.....	52
2.2.3.2.1. Infarktgröße.....	52
2.2.3.2.2. Wand- / Septumdicke und Granulationsgewebe	54
2.2.3.3. Immunhistochemie.....	54
2.2.3.3.1. BrdU-Färbung.....	55
2.2.3.3.2. Ki67-Färbung.....	55
2.2.3.3.3. Anti-CD31 (CD31).....	55

2.2.3.3.4. Anti-CD45 (CD45).....	56
2.2.4. Durchflusszytometrische Analyse.....	56
2.2.4.1. Grundprinzip der Durchflusszytometrie.....	56
2.2.4.2. Isolierung des Untersuchungsmaterials.....	57
2.2.4.2.1. Blut und Knochenmark.....	57
2.2.4.2.2. Herzgewebe.....	58
2.2.4.3. Aufbereitung des Untersuchungsmaterials.....	58
2.2.4.4. Messung und Analyse der Proben.....	59
2.2.5. Statistische Analyse.....	59
 3. ERGEBNISSE.....	 60
3.1. <u>Überleben nach 30 Tagen</u>	60
3.2. <u>Histologie</u>	61
3.2.1. Infarktgrößen.....	61
3.2.2. Wanddicken der linksventrikulären Vorderwand.....	62
3.2.3. Neoangiogenese - CD31+ Kapillaren in der Infarkt-Grenzzone.....	65
3.3. <u>Hämodynamik</u>	66
3.3.1. Messungen der Herzfunktion.....	66
3.3.2. Herzfrequenz.....	67
3.3.3. Linksventrikulärer endsystolischer Druck.....	67
3.3.4. Herzminutenvolumen.....	68
3.3.5. Ejektionsfraktion (EF).....	69
3.3.6. Arterielle Nachlast.....	69

3.3.7. Enddiastolisches Volumen.....	70
<u>3.4. Stammzellmobilisation und –Homing.....</u>	<u>71</u>
3.4.1. Stammzellmobilisation.....	71
3.4.2. Expression von Stammzellmarkern auf CD26 ⁺ Zellen aus dem Knochenmark und peripheren Blut.....	73
3.4.3. Stammzellhoming in das Herz.....	75
3.4.3.1. Blutstammzellen.....	76
3.4.3.2. Endogene kardiale Stammzellen.....	78
 4. DISKUSSION.....	 80
<u>4.1. G-CSF-Behandlung unter CD 26 Inhibition senkt die Mortalität und verbessert die Pumpfunktion.....</u>	<u>81</u>
<u>4.2. G-CSF Gabe mobilisiert Stammzellen im wt und CD26-/- Tier.....</u>	<u>82</u>
<u>4.3 G-CSF Gabe unter CD 26 Hemmung führt zu einem vermehrten Homing von CD34+/CXCR4+ Progenitorzellen Stammzellen in das Herz.....</u>	<u>83</u>
<u>4.4. Limitationen der Arbeit.....</u>	<u>86</u>
 5. ZUSAMMENFASSUNG.....	 88
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	90
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	115
DANKSAGUNGEN.....	117
LEBENS LAUF.....	119

1.EINLEITUNG

1.1 Myokardinfarkt

1.1.1. Epidemiologie

In Deutschland, sowie dem gesamten westeuropäischen Raum stehen Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems schon seit vielen Jahren an erster Stelle der Todesursachenstatistik. Laut Statistischem Bundesamt erlag 2010 fast jeder zweite Verstorbene einer Erkrankung des Kreislaufsystems (41,1%).

Die wichtigste spezifische Todesursachengruppe war dabei die der ischämischen Herzkrankheiten (133 126 Sterbefälle), darunter insbesondere der akute sowie der rezidivierende Myokardinfarkt mit insgesamt 59 107 Fällen (62 670 im Vorjahr) (1).

1.1.2.Pathophysiologie

Beim Myokardinfarkt handelt es sich um eine Akutkomplikation der Koronaren Herzerkrankung (KHK), die definiert ist als die Manifestation der Atherosklerose in den Herzkranzarterien. Die wichtigsten Risikofaktoren hierfür sind Diabetes mellitus, Rauchen, arterieller Hypertonus und Hypercholesterinämie/-triglyceridämie. Der pathologische Prozess verläuft so, dass sich über Jahre hinweg Lipide in die Gefäßwand einlagern und hierdurch eine entzündliche Reaktion hervorrufen, was zur Adhäsion von Monozyten und T-Lymphozyten führt und (2,3) außerdem die glatten Muskelzellen der Intima dazu animiert Kollagen zu produzieren. Im Folgenden kommt es dann zur Fibrosierung der Plaques und über kurz oder lang zu einer Einengung des Gefäßlumens (4,5,6). Aus Ablagerungen von Plaques an der Koronargefäßwand resultiert eine Einengung des Lumens, plötzliche Kraftanstrengungen oder Stresssituationen mit stärkeren Blutdruckschwankungen können dann auslösende Faktoren für eine Plaqueruptur mit thrombotischem Kompletverschluss sein (siehe Abb.1). Eine ausreichende Blut- und damit

Sauerstoffversorgung ist so nicht mehr gewährleistet, das betroffene Herzareal wird hypoxisch, es kommt zu einer ischämischen Myokardnekrose.

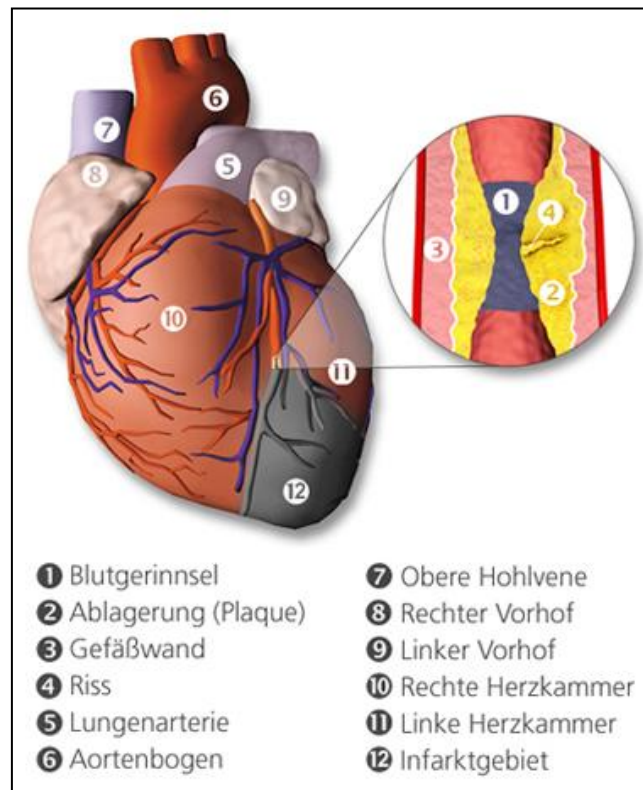


Abb.1 Schematische Darstellung eines Herzens mit Verschluss der linken Koronararterie (6b)

Hieraus resultiert der Umbau des linken Ventrikels, das Remodelling, gekennzeichnet durch Expansion und bindegewebige Vernarbung des Infarktgebietes, sowie aneurysmatische Wanddilataion der linken Kammer (7). Eine weitere Reaktion ist die Neoangiogenese in der Infarktnarbe, die jedoch unter physiologischen Bedingungen nicht ausgeprägt genug ist um den Sauer- und Nährstoffmangel zu kompensieren. Die schnelle Reperfusion der verschlossenen Arterie reduziert die Frühmortalität des akuten Myokardinfarktes signifikant und verbessert die Langzeitprognose des Patienten. „State-of-the-Art“ ist die akute perkutane Koronarintervention PTCA (Perkutane transluminale coronare Angioplastie) mittels Ballondilatation sowie gegebenenfalls die Einlage eines Stents (PCI) je nach Symptomatik mit oder ohne vorausgegangener intravenöser Fibrinolyse (siehe Abb.2).



Abb 2. Koronararterie vor (links) und nach (rechts) Wiedereröffnung mittels PTCA(7b)

Doch auch trotz rascher Wiederherstellung des Blutflusses und medikamentöser Langzeitprophylaxe mit ASS, ACE-Inhibitoren, Betablockern oder CSE-Hemmern, entwickelt sich auf Grund der o.g. Prozesse nicht selten eine Herzinsuffizienz (8). Die terminale Herzinsuffizienz (NYHA IV) ist bestmöglich nur mittels einer Herztransplantation therapierbar, wobei die Zahl der Spenderherzen zwar stetig steigt, aber immer noch sehr limitiert ist (9). Deshalb liegt die Vision der Kardiologie in einer Kausalbehandlung mit der das Remodelling langfristig vermieden oder reversibel gemacht werden kann. Eine Therapieoption hierfür könnte die myokardiale Stammzelltherapie sein.

1.2. Stammzelltherapie bei Myokardinfarkt

Als Stammzellen werden physiologische Zellpopulationen bezeichnet, die in der Lage sind, sich in unterschiedliche Zelltypen/ Gewebe auszudifferenzieren. Sie werden unterteilt in zwei Gruppen, die embryonalen und die adulten Stammzellen.

1.2.1. Embryonale Stammzellen

Unter embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) versteht man pluripotente Zelllinien, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen werden. Sie sind in der Lage sich *in vivo* sowie *in vitro* in Zellen aller drei Keimblätter, also Entoderm, Ektoderm

und Mesoderm, zu differenzieren. Da sie sich *in vitro* in einem ständigen Prozess der Selbsterneuerung und Proliferation befinden, können Zellen aller Entwicklungsstadien generiert werden, d.h., bezogen auf Kardiomyozyten, sogar spontan kontrahierende Herzmuskelzellen (10,11). Humane ES-Zellen, die aus Embryonen gewonnen werden, die durch In-vitro-Fertilisation entstanden und nicht mehr für Fortpflanzungszwecke in Gebrauch sind, wurden erstmals 1998 von James Thomson etabliert (12). Hinsichtlich einer klinischen Anwendung zeigen sich auf Grund von Teratogenität und immunologisch bedingten Abstoßungsreaktionen Probleme (13). Weiterhin unterliegt die Arbeit mit ES-Zellen aus ethischen Gründen starken Limitationen. In Deutschland ist es verboten menschliche Embryonen herzustellen, zu klonen oder zu zerstören (14). Bis vor kurzem war lediglich die Forschung an aus dem Ausland importierten ES-Zellen die vor dem 1.1.02 gewonnen wurden legal. Im April 2008 wurde nun die umstrittene Lockerung des Stammzellgesetzes durch den Bundestag beschlossen und der Stichtag für den Import auf den 1. Mai 2007 verschoben (15).

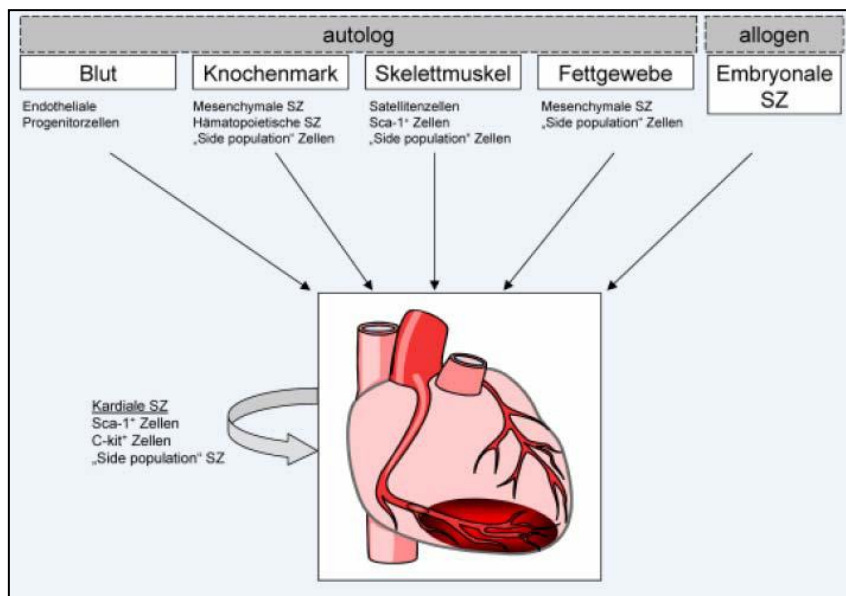


Abb. 3 Potenzielle Quellen zur Stammzellgewinnung für die kardiale Regeneration (16)

1.2.2. Adulte Stammzellen

Adulte (oder somatische) Stammzellen bilden über die gesamte Lebensdauer des jeweiligen Organismus hinweg neue, spezialisierte Zellen. Als wichtigste Quelle gilt das Knochenmark, das verschiedene Subtypen von Progenitorzellen wie die hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), die sog. „Side Population“ (17), mesenchymale Stammzellen (MSCs) (18) und multipotente adulte Progenitorzellen (MAPCs), eine Subpopulation der mesenchymalen Stammzellen (19) enthält. Für die Therapie der ischämischen Herzkrankheiten von Bedeutung sind ebenso endotheliale Progenitorzellen (EPCs), umbilikale somatische Stammzellen (USSCs) (20), skelettale Myofibroblasten (21, 22) und ortsständige kardiale Stammzellen (CSCs) (23) (siehe Abb.4).

Zelltyp	Quelle	Charakteristika	Literatur
Hämatopoetische Stammzellen (HSCs)	Knochenmark	CD34+, CD 45+, CD133+, c-kit+, sca-1+, Lin-	(16)
Side Population (SP)	Knochenmark	Ausschleusen des Farbstoffes Hoechst 33342 über den Transportkanal ABCG2	(24)
Mesenchymale Stammzellen (MSCs)	Knochenmark	Auf Fibronectin adhärente, nicht hämatopoetische Stromazellen des Knochenmarks CD44+, CD90+, CD105+, Stro-1+, CD34-,CD45-, CD133-	(18)
Multipotente adulte Progenitorzellen (MAPCs)	Knochenmark	Subtyp der MSCs Differenzierung zu Zelltypen aller drei embryonalen Keimblätter CD45-, Glykophorin A-	(19)
Umbilikale somatische	Nabelschnurblut	Subtyp der MSCs, Differenzierung zu	(20)

Stammzellen (USSCs)		Zelltypen aller drei embryonalen Keimblätter CD 44+; CD90+; CD105+, CD34-; CD45,c-kit-	
Endotheliale Progenitorzellen (EPCs)	Peripheres Blut	Isolation aus mononukleären Zellen ex vivo-Kultivierung CD31+; CD34+; CD133+; CD105+; KDR+, Tie-2+, CD45-	(25, 26)
Residente kardiale Stammzellen (CSCs; „Cardiospheres“)	Ortsständige Stammzellen	Isolation aus Myokardbiopsat ex vivo-Kultivierung negativ für hämatopoetische Marker hohe Telomerase-Aktivität aus adulten Herzen: c-kit+/-, Sca-1-ähnliche Epitope+, MDR1+, KDR1+ aus neonatalen Herzen: Isl-1+	(27, 28-33)
Skelettmyoblasten	Ortsständige Stammzellen	Isolation aus Skelettmuskelbiopsat ex vivo-Kultivierung, CD56+	(34)

Abb.4 Übersicht der Subpopulationen humaner adulter Stammzellen für die Zelltherapie ischämischer Herzerkrankungen (35)

1.2.3. Stammzelltransplantation

Auf dem Gebiet der Kardiologie gibt es die meiste klinische Erfahrung mit Stammzelltransplantationen, die Applikationsmethoden sind intravaskulär, transepikardial sowie transendokardial. In tierexperimentellen Untersuchungen konnte bereits belegt werden, dass humane mononukleare Knochenmarkszellen nach Injektion in die Infarkttrandzone im infarzierten Myokardgewebe proliferieren und zu kardiomyozytären Zellen differenzieren, sodass es zu einer myokardialen Regeneration des Herzens kommt (36,37,38), die zu einer Verbesserung der globalen Pumpfunktion führt (39). Klinisch wurden bisher ausschließlich Zellen aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut eingesetzt (40). Bei allen bisher veröffentlichten Studien zeigten sich nach 4-6 Wochen Verbesserungen im Bereich

der Auswurfraction (Anstiege um 7-9%), der Perfusion des Infarktareals sowie ein vermindertes enddiastolisches linkventrikuläres Volumen. Komplikationen bei der intrakoronaren Infusion der Zellen wurden nicht beschrieben (41-45). Bezüglich der Langzeiteffekte weisen Daten der TOPCARE-AMI-Studie magnetresonanztomographisch auch nach 12-24 Monaten die verbesserte linksventrikuläre Pumpfunktion ohne reaktive Hypertrophie nach (46, 47). Prospektiv randomisiert konzipierte Studien mit größeren Patientenkollektiven wie die von Janssens et al., bei der sich eine Verkleinerung der Infarktfläche zeigte und die skandinavische ASTAMI-Studie konnten allerdings keine Verbesserung hinsichtlich der Pumpfunktion registrieren (48,44). Die in Deutschland durchgeführte multizentrische REPAIR-AMI-Studie hingegen weist nach vier Monaten eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion in der mit unfraktioniertem Knochenmark behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe (5,5% versus 3% in der Kontrollgruppe, $p=0,01$) auf. Im Langzeitverlauf nach einem Jahr kam es zu einer ebenfalls signifikanten Reduktion der Endpunkte (45). Die BOOST-Studie zeigte zwar einen Anstieg der globalen linksventrikulären Funktion sechs Monate nach Transplantation, nicht jedoch in der 18-Monats-Kontrolle (49) (siehe Abb. 5).

Studie	Zelltyp	Zellzahl (x10 ⁶)	Patienten	Effekte
Strauer et al. (41)	BMC vs. Ko.	28	20 vs. 20 Ko	Regionale Kontraktilität (LVA) ↑Endsystolisches Volumen (LVA) ↓ Perfusion (Szintigraphie) ↑
TOPCAREAMI (42, 46, 47, 50, 51)	BMC bzw. EPCs	213 (BMC) bzw. 16 (EPCs)	30 (BMC) bzw. 29 (EPCs)	BMC: Globale Kontraktilität (LVA/MRT) ↑ Vitalität (PET, MRT) ↑Endsystolisches Volumen (LVA) ↓ Koronare Flussreserve (i.c. Doppler) ↑
BOOST (49)	BMC vs. random. Ko.	2460	30 vs. 30 Ko.	Globale Kontraktilität (MRT) ↑

Fernandez-Aviles (43)	BMC	78	20	Globale Kontraktilität (MRT)↑ Endsystolisches Volumen (MRT)↓
Janssens et al. (48)	BMC	304	33 vs. 34 Ko	Globale Kontraktilität (MRT)→Infarktgröße (MRT)↓
ASTAMI (44, 52);	BMC vs. random. Ko	87	50 vs. 50 Ko.	Globale Kontraktilität (MRT, SPECT, Echo)→ Endsystolisches Volumen (MRT, Echo) → Enddiastolisches Volumen (MRT, Echo) →
Repair-AMI (45, 53)	BMC vs. random. Ko	236	101 vs. 103 Ko.	Globale Kontraktilität (LVA)↑

Abb.5 Intrakoronare Stammzelltherapie bei akutem Myokardinfarkt (49a)

1.2.4. Stammzellmobilisation

Neben der Transplantation, bzw. Injektion von Stammzellen in das geschädigte Gewebe besteht des weiteren die Möglichkeit der Mobilisation von endogenen zirkulierenden Stammzellen aus dem Knochenmark (35, 54). Wachstumsfaktoren wie der „*granulocyte colony stimulating factor*“ (G-CSF), der „*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*“ (GM-CSF), das Interleukin 3 (IL-3), der „*Vascular endothelial growth factor*“ (VEGF) und der „*stem cell factor*“ (SCF) werden vorrangig zur Aktivierung der „Mobilisations-Maschinerie“ verwendet. Weitere Substanzen mit stammzellmobilisierender Wirkung sind in Abbildung 6 ersichtlich.

Klasse	Beispiel	Effekte
Wachstumsfaktoren (38, 55-58)	G-CSF; GM-CSF; IL-3; VEGF; SCF; EPO	Aktivierung + Expansion von Granulozyten ↑; MMP-9 ↑;
Chemokine (59-61)	CXCL2; CXCL8; SDF-1; IL-8	Direkte Aktivierung von Granulozyten ↑
Hormone (62)	Östrogen	Endotheliales NO ↑
Medikamente (63)	Statine	PI3K/Akt ↑
Toxine (64)	Pertussis Toxin	CXCR4/SDF-1 ↓
Stress (65)	Intensive Bewegung	Endotheliales NO ↑
Immunsuppression (64)	Cyclophosphamid;	5-FU Expansion von Granulozyten ↑

Abb.6 Stammzellmobilisierende Substanzen im Überblick (49a)

1.2.4.1. G-CSF

Bei dem Glykoprotein G-CSF handelt es sich um einen physiologischen Wachstumsfaktor, der von hämatopoetischen Zellen wie Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten, aber auch von Fibroblasten, Astrozyten und stromalen Knochenmarkzellen gebildet wird (66). Zu einer Ausschüttung kommt es bei extremen körperlichen Stresszuständen, wie entzündlichen Prozessen und Sepsis (67), aber auch bei akutem Myokardinfarkt (68, 69). Der Faktor erfüllt nach Bindung an seinen spezifischen Rezeptor G-CSFR (CD114) , der u.a. von neutrophilen Granulozyten, Progenitorzellen, Endothelzellen, Kardiomyozyten und Koronararterien exprimiert wird, essentielle Aufgaben im Bereich der Hämatopoese (70-74). Zum einen regt er hämatopoetische Blutstammzellen, genauer die Kolonieformende-Einheit-Granulozyt (CFU-G) zur Proliferation und Differenzierung zu Granulozyten an (75,76). Auf diese reifen neutrophilen Granulozyten wirkt der Faktor dann regulierend hinsichtlich Chemotaxis, Migration und Superoxidproduktion (77-79). Zum anderen interagiert G-CSF an verschiedenen Stellen mit Rezeptoren und Liganden und führt so zur Mobilisation von Stammzellen. Neben dem vaskulär endothelialen Cadherin (VE-Cadherin) und der Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9)

spielt hierbei insbesondere der SDF-1/ CXCR-4 – Komplex eine wichtige Rolle (80-85).

1.2.4.2. Klinische Studien mit G-CSF

In den bisher durchgeführten klinischen Studien mit G-CSF zeigte sich insgesamt eine gute Verträglichkeit ohne das Auftreten schwerwiegender Nebenwirkungen. Hinsichtlich der Effektivität der G-CSF-Therapie bei Herzerkrankungen waren die Ergebnisse jedoch kontrovers. So konnte in der FIRSTLINE-AMI- Studie und bei Kuethe et al. eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verbesserte Pumpfunktion ein Jahr nach Myokardinfarkt verzeichnet werden. In den darauf folgenden Studien REVIVAL-2, STEMMI und G-CSF-STEMI mit verbessertem Design und größerer Fallzahl, war dieser positive Effekt jedoch nicht nachweisbar, auch die Infarktgröße war nicht signifikant geringer. Als möglicher Grund für diese Diskrepanz wurde in Hinblick auf die Daten von Harada et al, die eine verminderte Effektivität von G-CSF bei verzögerter Gabe (im Tiermodell) postulieren, die Wahl des Zeitfensters (FIRSTLINE/90 min post MI v.s STEMMI,G-CSF-STEMI/31/30 h post MI) gesehen (74). Die Mobilisierung mit G-CSF nach einem Schlaganfall zeigte, in Abhängigkeit von der National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) eine deutliche Signifikanz mit um 20% verbesserten Werten. Die wichtigsten klinischen Studien sind in Abbildung 7 zusammengefasst.

TABELLE 1					
Die wichtigsten derzeit veröffentlichten klinischen Studien der Mobilisierung von Knochenmarkstammzellen zur Organregeneration					
Organ	Indikation	Protokoll	Patienten, Studienart	Ergebnis	Referenz
Herz	ST-Streckenhebung Myokardinfarkt	10 µg/kg G-CSF oder Placebo	114, randomisiert, doppelblind	kein Einfluss auf Infarktgröße, LVEF oder Restenosierungsrate	Zohnhofer et al. (e9)
Herz	ST-Streckenhebung Myokardinfarkt	10 µg/kg G-CSF oder Placebo	78, prospektiv, randomisiert, doppelblind	kein Einfluss auf systolische Wanddicke, Ejektionsfraktion	Ripa et al. STEMMI (e8)
Herz	ST-Streckenhebung Myokardinfarkt	10 µg/kg G-CSF	50, Randomisierung nach Reperfusionstherapie	verbesserte enddiastolische Wanddicke, signifikante Verbesserung der LVEF in Behandlungsgruppe	FIRSTLINE AMI (e7)
Herz	ST-Streckenhebung Myokardinfarkt	5 µg/kg G-CSF (4 Tage)	20, randomisiert	kein Unterschied des Perfusionsdefektes, LVEF-Anstieg nicht signifikant	Valgimigli (e13)
Herz	transmuraler Myokardinfarkt	10 µg/kg G-CSF 7 Tage, 48 h nach Stent	23, nicht randomisiert, open-label	signifikanter Anstieg der Ejektionsfraktion in beiden Gruppen, größer bei mobilisierten Patienten	Kueth (e14)
Herz	ST-Streckenhebung Myokardinfarkt	G-CSF 10 µg/kg/Tag (5 Tage)	44, randomisiert, doppelblind, placebo-kontrolliert	nach 3 Monaten keine signifikante Verbesserung der LVEF bei mobilisierten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe	Engelmann et al. (e54) G-CSF STEMI
Herz	koronare Herzkrankheit (KHK)	40 µg GM-CSF intrakoronar, 10 µg/kg (2 Wochen s.c.)	21, randomisiert, doppelblind, placebo-kontrolliert	Anstieg des koronaren Kollateralfusses der Behandlungsgruppe	(e11)
Gefäße	arterielle Verschlusskrankheit (AVK)	10 µg/kg GM-CSF alle 2 Tage (14 Tage)	40, randomisiert, placebokontrolliert	keine Unterschiede in der Laufzeit bis zur Claudicatio intermittens	(e12)
Gehirn	akuter zerebraler Infarkt	15 µg/kg (5 Tage)	10, randomisiert, verblindet	Verbesserung des NIHSS nach 6 Monaten in der G-CSF-Gruppe	(e15)

Die Studien wurden anhand einer Medline-Suche identifiziert. Aus dem Bereich der Kardiologie sind nur randomisierte Studien mit mehr als 20 Patienten aufgezeigt. Aus anderen Gebieten wurden auch unrandomisierte und kleinere Studien erwähnt.
G-CSF, „granulocyte colony stimulating factor“; GM-CSF, „granulocyte-macrophage colony stimulating factor“; LVEF, linksventrikuläre Ejektionsfraktion

Abb. 7 Wichtige klinische Studien zur Stammzellmobilisation mit G-CSF Stand 2007 (86)

1.2.5. Stammzellhoming

Neben der Mobilisierbarkeit hämatopoetischer Stammzellen ist eine weitere Grundlage und damit Forschungsfokus für diese Therapieform die Rückkehr der i.v. transplantierten Zellen in das Knochenmark, genannt „*Homing*“. Unter „*Homing*“ versteht man den Prozess der gezielten Einwanderung von Stammzellen aus dem peripheren Blut in das Knochenmark, mit multifaktorieller Beteiligung von Adhäsionsmolekülen, parakrinen Zytokinen, Extrazellulärmatrix und chemotaktischen Faktoren (87). Die Migration der Stammzellen verläuft dabei, nahezu analog der Leukozytenextravasation, in mehreren Schritten ab: Nach dem noch reversiblen „*Rolling*“ entlang der Gefäßwand kommt es zu einer festen Adhäsion, gefolgt von einer transendothelialen Migration und schließlich dem „Einnisten“ in die Stammzellnische des Knochenmarkstromas (88,89). Bei Adhäsion und Migration spielen Liganden für G-Protein-gekoppelte chemotaktische Rezeptoren (GPR) eine

wichtige Rolle, die von Stammzellen exprimiert werden und von denen einige bereits identifiziert werden konnten:

- der Leukotrienrezeptor CysLT1 auf der Oberfläche von zirkulierenden Progenitorzellen, (insbesondere unreifen Progenitorzellen, CD34+ Leukämieblasten und Komponenten des Knochenmarkmikromilieus) der außerdem noch stimulierend auf die Proliferation hämatopoetischer Progenitorzellen wirkt (90,91)
- Rezeptoren für den Lipidmediator Sphingosin-1-Phosphat (S1P), insbesondere S1P1 in Kombination mit seinem Rezeptoragonisten FTY720, die auch in vivo eine Steigerung des Knochenmarkhomings von CD34+/CD38- Progenitorzellen zeigten (92,93)
- der Stromal-cell-derived-factor-1 (SDF-1) mit seinem auf Stammzellen exprimierten Rezeptor CXCR4, der durch die Dipeptidylpeptidase IV/CD26 inaktiviert werden kann.

1.3. Dipeptidylpeptidase IV/ CD26

1.3.1. Vorkommen

Die Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV, CD26, ADAbp, EC 3.4.14.5.) wurde erstmals 1966 von Hopsu-Havu und Glenner aus Rattenleber isoliert und als „Glycyl-Prolyl-Naphtylamidase“ beschrieben (94). Es handelt sich um eine Serinprotease (95) die der Untergruppe der Prolyl oligopeptidasen (POP) angehört und als solche die Fähigkeit besitzt, Dipeptide mit der N-Terminalen Sequenz X-Pro und X-Ala von Proteinen abzuspalten (96,97). Ebenfalls zur POP-Familie gehören die Prolyl Endopeptidase [EC 3.4.21.26] (98), die Oligopeptidase B [EC 3.4.21.83] (99) und die Acylaminoacylpeptidase [EC 3.4.19.1] (100). Die Bandbreite des Vorkommens erstreckt sich über die unterschiedlichsten Lebensformen: Neben Mensch und Säugetier konnte die DPPIV aus Bakterien, Hefepilzen, Insekten und Pflanzen isoliert werden (101-103). Exprimiert auf Endothelzellen, aktivierten Lymphozyten und Epithelzellen findet sich CD26 bei Mensch und Tier im gesamten Organismus, besonders hohe Konzentrationen zeigen sich allerdings in Plazenta, Niere, Leber und Dünndarm (104-107). Eine lösliche Form konnte in Serum und humanem Urin detektiert werden (108,109). Für die hier thematisierte Versuchsreihe von Bedeutung,

zeigten DNA-Vergleiche von CD26 zwischen Maus und Mensch Homologien von ca. 89% innerhalb der Eukaryoten (112), die Halbwertszeiten sind abhängig von der Zelllinie und variieren zwischen 15 bis 80 Stunden (110,111).

1.3.2. Struktur

1.3.2.1 Tertiärstruktur

Die homodimere, membranständige Form der DPPIV gehört zum Typ II der integralen Membranproteine (113). Das Molekulargewicht jedes Monomers ist mit 110 bis 150 kDa beschrieben (114,106,115). Diese Spannweite ist durch unterschiedliche Spezies, Gewebeherkunft und den Grad der Glykosylierung zu erklären. Die DPPIV ist eine Polypeptidkette aus 766 Aminosäuren, aufgeteilt in 5 funktionelle Domänen: eine Cytoplasmatische - Domäne aus 6 AS, eine Transmembran - Domäne, die das Enzym auf der Zelloberfläche verankert, bestehend aus 22AS, eine glykosylierte- (29-323), eine cysteinreiche- (324-551) und eine C-terminal-katalytische Region (552-766) die zusammen die extrazelluläre Domäne bilden (116) (siehe Abb.8). Bei der löslichen Form fehlen der intrazelluläre- und der Transmembranbereich, hier beginnt die Sequenz zwischen den Aminosäuren 29 und 39, die enzymatische Aktivität bleibt dabei jedoch erhalten (117-119).

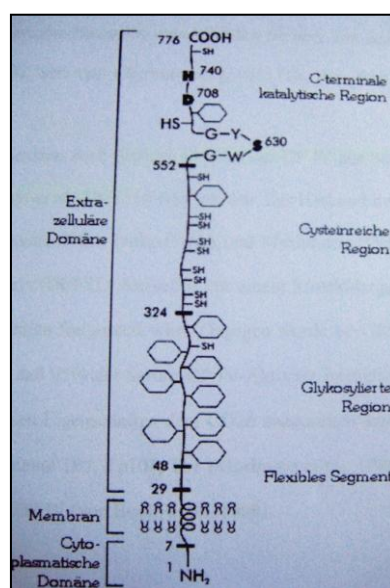


Abb 8. Aufbau der DPPIV (120)

1.3.2.2. Kristallstruktur

Im Jahr 2003 gelang es verschiedenen Forschungsgruppen auch die Kristallstruktur der DPPIV zu entschlüsseln. Jede Monomer-Untereinheit gliedert sich in zwei Bereiche auf: Eine α/β Hydrolase-Domäne mit einem zentralen β -Faltblatt umgeben von α -Helices (katalytische Domäne) und eine β -Propeller-Domäne aus 8 Faltblättern mit jeweils 4 antiparallelen Strängen. (siehe Abb. 9)

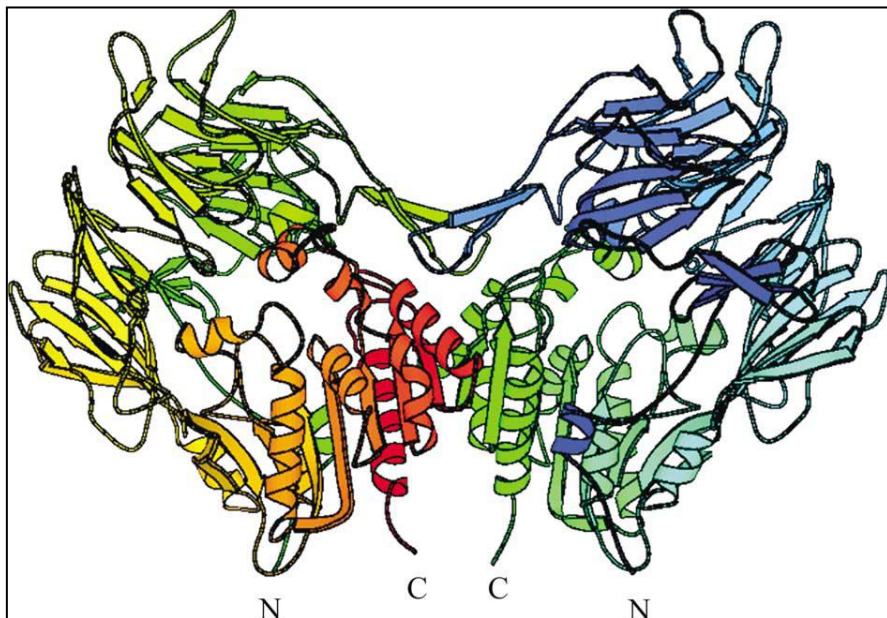


Abb.9 3-D Struktur der DPPIV (121)

Die Gruppierung zum Dimer erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen an zwei Stellen : zwischen Ile237 – Thr 251 im N-Terminalen Bereich, sowie zwischen Ala 717 – Thr 736 im C-terminalen Segment.(122,123) Als Substrateingang werden zwei Varianten diskutiert: Eine Zugangsmöglichkeit bietet der zentrale Tunnel (T), der sich aus der Anordnung der β -Faltblätter ergibt und über den das katalytische Zentrum erreicht werden kann. Alternativ kann der Eintritt über eine etwas größere Höhle (H) seitlich am Übergang zwischen β -Propeller und α/β -Hydrolasedomäne erfolgen. (121) (Siehe Abb.10)

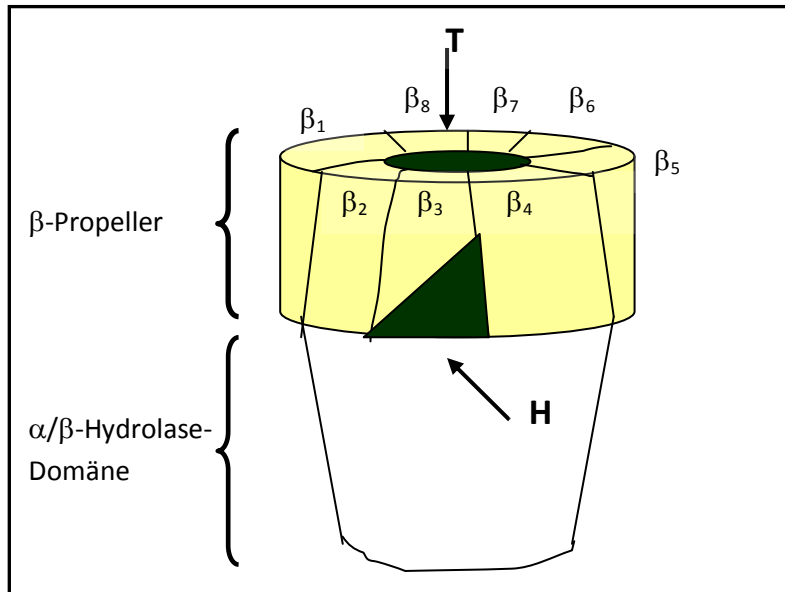


Abb.10 Vereinfachtes Modell des Substratzugangs der DPPIV

1.3.3. Inhibitoren

Die DPPIV wird irreversibel aber unspezifisch von den klassischen Serinproteaseinhibitoren Diisopropylfluorophosphat (DFP), Diethylpyrokarbonat und PMSF gehemmt (124). Die einzigen bekannten natürlichen Inhibitoren sind neben den Xaa-Pro- und Xaa-Ala-Dipeptiden, das HIV-1 Tat-Protein (125) und der N-Terminus des TXA2-Rezeptors (126). Die 1984 von Umezawa et al. postulierte inhibitorische Wirkung von Diprotin A (Ile – Pro – Ile) und Diprotin B (Val – Pro – Leu) wurde 7 Jahre später widerlegt (127). Die Forschungsgruppe um Rahfeld stellte fest, dass es sich bei beiden Peptiden um Substrate der DPPIV handelt und die Inhibitorwirkung als „kinetisches Artefakt“ zu bewerten ist (128). Peptidylammoniummethylketone, die nach dem Prinzip des Slow-binding-Mechanismus wirken, haben eine inhibitorische Aktivität im mikromolaren Bereich, die in wässrigem Milieu allerdings durch intramolekulare Reaktionen nur für wenige Minuten anhält (129). Letzteres gilt auch für die Peptidboronsäure, einen tight-binding-Inhibitor mit größter Effektivität (130, 131). Weitere kompetitive Hemmer sind Substratanaloga (z.B. Chlormethylketone) und Produktanaloga wie Valpyrrolidine (Val-Pyr), sowie Diphenylphosphatester, Thioxoaminosäure-pyrrolidide und –thiazolidide (133-136).

1.3.4. Substratspezifität

Wie bereits beschrieben ist die DPPIV in der Lage, die Freisetzung N-terminaler Dipeptide von Oligopeptiden und Polypeptiden zu katalysieren. Voraussetzung dafür ist, dass sich in vorletzter Position der Peptidkette ein Prolin oder Alanin befindet (137, 138). Zusätzlich werden auch Ala, Hydroxyprolin, Serin, Glycin, Validin und Leucin an dieser Stelle akzeptiert, allerdings mit abnehmenden Spezifitätskonstanten (139), was im Vergleich der k/K -Werte klar ersichtlich ist. (k/K zwischen $3 \cdot 10^6$ M für Prolin in P_1 -Position und $4 \cdot 10^4$ M für Leucin in P_1 -Position) (140). In der P_1' -Position sind alle Aminosäuren mit Ausnahme von Prolin, Hydroxyprolin, N-alkylierte Reste und D-Aminosäuren möglich (104). Steht Prolin in P_1 -Position, ist die L-Konfiguration des Aminosäurerestes in P_1 - und P_2 -Position Grundvoraussetzung für die enzymatische Hydrolyse. Substrate mit Alanin in P_1 -Position werden hingegen auch dann noch akzeptiert, wenn die Aminosäure in P_2 -Stellung in D-Konfiguration vorliegt (141,142).

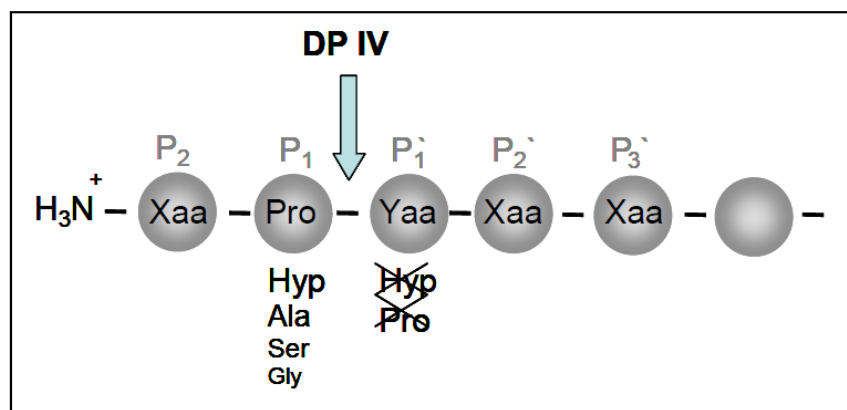


Abb 11 : Darstellung der Substratspezifität der DPPIV (142a)

1.3.5. Proteaseaktivität

Durch ihre Proteaseaktivität spielt die DPPIV eine wichtige Rolle als Regulator der physiologischen Wirksamkeit von biologisch aktiven prolinhaltigen Peptidhormonen, Neuropeptiden und Chemokinen.

Hierzu gehören die vasoaktiven Neuropeptide Y (PY) und YY (PYY) und die Substanz P, welche erst nach „Vorarbeit“ der DPPIV der vollständigen Hydrolyse durch Aminopeptidase N (APN) zugänglich ist (143-146). β -Casomorphin, ein exogenes Opioidpeptid, das bei der Entwicklung des Nervensystems involviert ist, wird durch CD26 Spaltung inaktiviert (147,148). Ebenso verliert das analgetisch wirksame Tetrapeptid Endomorphin-2 seine Funktionsfähigkeit (149). Daneben konnte sowohl in vitro, als auch in vivo die Prozessierung der gastrointestinalen Peptide Enterostatin, Glucagon-Like-Peptide (GLP) und Glucose-Dependent-Insulinotropic-Polypeptide (GIP) nachgewiesen werden (143,150-153). Die Hydrolyse eines N-terminalen Peptids von Fibrin durch DPPIV führt zur Hemmung der Fibrinpolymerisierung und somit zur negativen Beeinflussung der Blutgerinnung (154). Des Weiteren greift CD26 in die Wachstumsregulation durch Inaktivierung von Somatoliberin (GRF) ein (155,156), hemmt das Chemokin RANTES (157,158) sowie den Stromal-Cell-Derived-Factor-1 α (SDF-1 α) (159). Weitere Substrate mit Struktur siehe Abbildung 12. Zusammenfassend kann man sagen, dass sich das Wirkspektrum von CD26 hier auf die unterschiedlichsten physiologischen Prozesse erstreckt, von der enteralen Proteinresorption, renalen Peptidrückgewinnung, Regulation der Insulinproduktion und Chemotaxis von Monozyten über Blutgerinnung, Blutdruckregulation, perinatalen Schmerzempfindung und Speichelsekretion, bis hin zu Ovulation, Wundheilung und Immunregulation.

Peptide	N-Terminus	AS
Peptidhormone		
GRH (1-44)	Tyr-Ala-Asp-Ala-	44
GIP	Tyr-Ala-Glu-Gly-	42
GLP-1	His-Ala-Glu-Gly-	30
GLP-2	His-Ala-Asp-Gly-	33
PHM	His-Ala-Asp-Gly	27
Enterostatin	Val-Pro-Asp-Pro-Arg	5
Chemokine		
RANTES	Ser-Pro-Tyr-Ser-	68
GCP-2	Gly-Pro-Val-Ser-	73
SDF-1 α	Lys-Pro-Val-Ser-	68
SDF-1 β	SDF-1 β	72
MDC	Gly-Pro-Tyr-Gly-	69
MCP-2	Gln-Pro-Asp-Ser-	76
Eotaxin	Gly-Pro-Ala-Ser-	74
IP-10	Val-Pro-Leu-Ser-	77
LD78 β	Ala-Pro-Leu-Ala-	70
MIP-1 β	Ala-Pro-Met-Gly-	69
Neuropeptide		
Tyr-melanostatin	Tyr-Pro-Leu-Gly	4
Endomorphin 2	Tyr-Pro-Phe-Phe	4
β -Casomorphin	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-	5-9
Substanz P	Arg-Pro-Lys-Pro-	11
Gastrin-Releasing-Peptide	Val-Pro-Leu-pro-Ala-	27
Neuropeptide Y	Tyr-Pro-Ser-Lys-	36
Peptide YY	Tyr-Pro-Ile-Lys-	36

Abb. 12: Übersicht der DPP IV- spezifischen Substrate (modifiziert nach (144,159))

1.3.6. Zelladhäsionsmechanismen

Neben der enzymatischen Aktivität hat CD26 biologische Bedeutung als Assoziationsmolekül/Vermittler von Zell-Zell und Zell-Matrix-Adhäsionsprozessen. Erstmals 1993/94 gelang Kameoka et al. und de Meester et al. der Nachweis, dass es sich bei der DPPIV und dem Adenosindesaminase-Bindeprotein (ADAbp) an der Zelloberfläche von T-Zellen um ein und dieselbe Substanz handelt (160,161). Die Adenosindesaminase (ADA) reduziert durch Katalyse der irreversiblen Desaminierung die lokale Adenosinkonzentration und führt so indirekt zu einer Verstärkung der T-Zell-Proliferation, die ansonsten von Adenosin gehemmt wird (162,163). Die genaue Funktion ist noch nicht geklärt, es wird jedoch eine immunregulatorische Bedeutung durch die DPPIV/CD26-ADA-Assoziation angenommen.

Unabhängig von der enzymatischen Aktivität existieren Wechselwirkungen zwischen CD26 (aus Rattenleber/Mausfibroblasten isoliert) und Kollagen (164,165) sowie Fibronectin (166) mit zwei separaten Bindungsstellen in der cysteinreichen Region der Extrazellulären Domäne (159). Die Interaktion mit Fibronectin wird auch als Mechanismus für metastatische Brustkrebszelladhäsion auf Lungenkapillaren (im Rattenmodell) vermutet (167,168).

1.3.7. Funktion bei Immunprozessen, HIV

Wie unter 1.3.1. bereits erwähnt, wird CD 26 ebenfalls auf Lymphozyten, nämlich vorwiegend auf aktivierten T- und B-Lymphozyten exprimiert, hieraus wurde auf eine Rolle bei der Initialisierung entzündlicher Reaktionen geschlossen (169,170). Des Weiteren sind CD 26-positive T-Lymphozyten in der Lage Interferon- γ zu produzieren (171). Dang und Tanaka (1990/1993) konnten eine direkte kostimulatorische Funktion der DPPIV/CD26 bei der Aktivierung von T-Helferzellen durch Crosslinking-Studien mit monoklonalen Antikörpern gegen DPPIV/CD26 und CD3 beweisen (172,173). In der Praxis wurden außerdem bei Transplantatabstoßungen und Autoimmunerkrankungen wie Systemischer Lupus Erythematoses und rheumatoider Arthritis, Aktivitätsänderungen der DPPIV festgestellt (174-177). Auch bei der Pathogenese der HIV-Infektion spielt CD26 eine Rolle. Eine Interaktion mit dem gp120/gp41 Proteinkomplex, welcher interzelluläre Membranfusion und Apoptose initiiert, konnte nachgewiesen werden, eine erhöhte Expression von CD26 auf CD4 positiven Zellen korrelierte mit einer ebenfalls erhöhten Apoptoserate (178). Martinez-Navio et al. zeigten kürzlich, dass gp120 bei HIV-infizierten andererseits die Adenosin-Desaminase-CD26 Interaktionen vermindert und somit die Zytokin-Produktion hemmt (179).

1.3.8. CD26 und Diabetes

Eine große Bedeutung hat die DPPIV in den letzten Jahren vor allem für die Behandlung des Diabetes mellitus Typ II gewonnen. CD26 gilt als das Hauptenzym bei der N-Terminalen Spaltung und somit Inaktivierung des Glucagon-like-Peptid-1 (GLP-1) sowie von Glucose-dependent-insulinotropic polypeptide (GIP), die eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zuckerhaushalts durch Glucose-abhängige Stimulierung der Insulinsekretion spielen (151, 180,181). Unmittelbar nach der Synthese des GLP-1 in den L-Zellen des distalen Gastrointestinaltrakts, kann die DPPIV angreifen und innerhalb von nur 1-2 Minuten bereits 50% des freigesetzten GLP-1 inaktivieren, noch bevor dieses in den Blutkreislauf eintreten kann (120,182-185). Durch Blockade dieser Interaktion mittels DPPIV-Inhibitoren kommt es zu vermehrter GLP-1 Aktivität und somit auch gesteigerter Insulinfreisetzung aus den β -Zellen des Pankreas, was zu einer signifikanten Senkung der Blutglucosekonzentration führt. Dies konnte einerseits im Tierversuch bewiesen werden: die genetische Inaktivierung von CD26 bei Mäusen führte zu höheren GLP-1-, GIP- und Insulin - Konzentrationen im Blut, sowie zu besseren Werten im oralen Glucose-Toleranz –Test (oGTT) (186). Zum anderen überzeugten die Daten einer klinischen Studie von Raz et al. mit 521 Patienten. Hier zeigten sich signifikante Effekte nach 18-wöchiger Monotherapie mit dem Inhibitor Sitagliptin im Bezug auf β -Zell-Funktion, HbA1c-Werte, postprandiale Zucker- und Insulinwerte im Vergleich zur Placebo-behandelten Gruppe. Hierbei konnte der HbA1c maximal um 1,2% gesenkt werden (187). Ähnlich gute Ergebnisse konnten mit dem CD26-Hemmer Vildagliptin erzielt werden (188). Seit April 2007 ist Sitagliptin (Januvia MSD) zur Kombinationstherapie mit Metformin oder Thiazolidindion (PPAR γ -Agonisten) in der EU zugelassen, Vildagliptin (Galvus Novartis Pharma) folgte im Oktober 2007 (189).

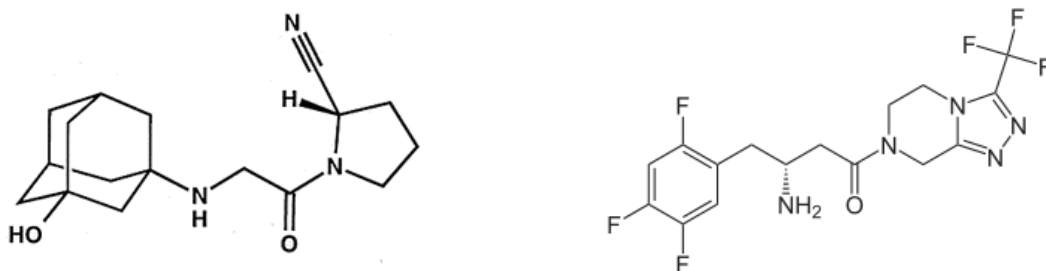


Abb. 13: Strukturformeln von Vildagliptin (links) und Sitagliptin (rechts)(189a)

1.4. CD26-abhängige Mechanismen von Stammzellhoming und Stammzellmobilisation

1.4.1. Interaktion von CD26 mit SDF-1/CXCR4 - Stammzellhoming

SDF-1 (auch CXCL12 genannt) gehört zur Familie der Chemokine, die mittels Interaktion mit ihren jeweiligen Chemokinrezeptoren, auf Prozesse der Hämatopoese, der Migration, des Homings, der Mobilisation, Proliferation und Überleben von HSC und HPC Einfluss nehmen können (190). Das Protein hat eine molare Masse von 8 kDa und setzt sich aus 68 Aminosäuren zusammen. Bezüglich der Aminosäuresequenz besteht eine 99%ige Homologie zwischen CXCL12 des Menschen und der Maus. Die Erstbeschreibung als chemotaktischer Faktor für unreife CD34 Progenitorzellen erfolgte erstmals 1997 von Aiuti et al. (191). Exprimiert wird SDF-1 auf Endothelzellen in ischämischen Gebieten (192) sowie auf Stromazellen im Knochenmark (193,194) und weiteren Organen wie Milz, Lunge, Leber. Der korrespondierende Rezeptor CXCR4 ist ein Mitglied der CXC-Chemokinrezeptorfamilie und an das heterogene Protein G 1 gekoppelt. Es ist der einzig relevante Chemokinrezeptor auf hämatopoetischen Stammzellen, insbesondere den CD34+ Zellen (195). Beim Vorgang des Homings kommt es zunächst nach SDF-1 Aktivierung zur Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration, die CD34+ Zelle „rollt“ daraufhin mit Hilfe von Integrinen und Selektinen dem Gradient folgend an der Gefäßwand entlang, bevor es nach kurzer Adhäsion mittels ICAM-1 durch das Endothel hindurch diffundiert und durch erneutes „Andocken“ von CXCR4 an von Stromazellen exprimiertem SDF-1 am jeweiligen Zielort fixiert wird (196). Darüber hinaus moduliert SDF – 1 die VLA – 4 abhängige Adhäsion an Fibronektin und VCAM - 1 (197). Bei dem beschriebenen Vorgang spielt die Bindung von CXCL 12 an seinen spezifischen Rezeptor CXCR4 die entscheidende Rolle (198,199). Wird aktives SDF-1 durch die Ektopeptidase CD26, die ebenfalls auf Populationen CD34+ sowie Sca-1+/c-kit+/lin- Zellen exprimiert wird (200), am N-terminalen Ende gespalten, verliert SDF-1 seine chemotaktische Wirksamkeit auf zirkulierende CXCR4+ hämatopoetische Stammzellen (201). (siehe Abb. 14)

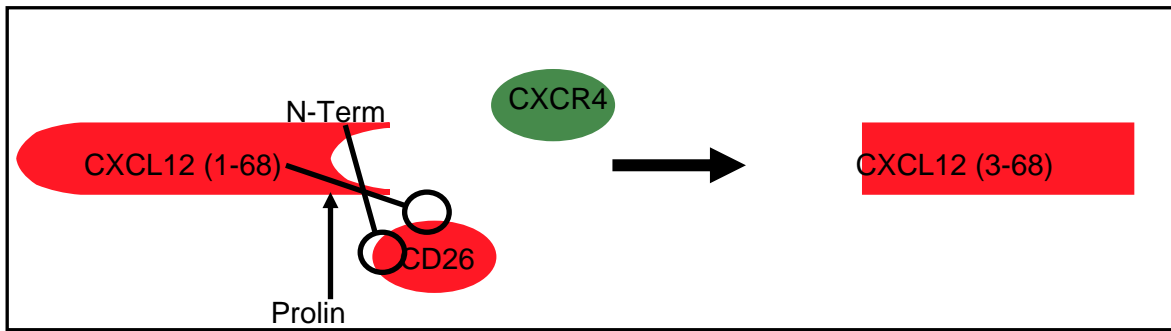


Abb. 14: Inaktivierung von CXCL12 durch CD26

Die Arbeitsgruppe um Christopherson konnte *in vitro* sowie im Mausmodell zeigen, dass nach gezielter Hemmung, bzw. Ablation des CD26 Gens, ein gesteigertes Homing von hämatopoetischen Stammzellen und Knochenmark-Spenderzellen aus dem peripheren Blut in das Knochenmark stattfindet (201) (siehe Abb 15.). Des Weiteren zeigten die CD26 – defizienten Tiere nach Transplantation von Knochenmarkzellen langfristig ein deutlich besseres *Engraftment*. In einer weiteren *in vivo* Studie an Ratten von Segers et al konnte bei intramyokardialer Injektion von MMP2- und CD26 – resistentem SDF-1 nach Myokardinfarkt eine verbesserte Herzfunktion sowie ein vermehrtes Einwandern von Progenitorzellen nachgewiesen werden (202).

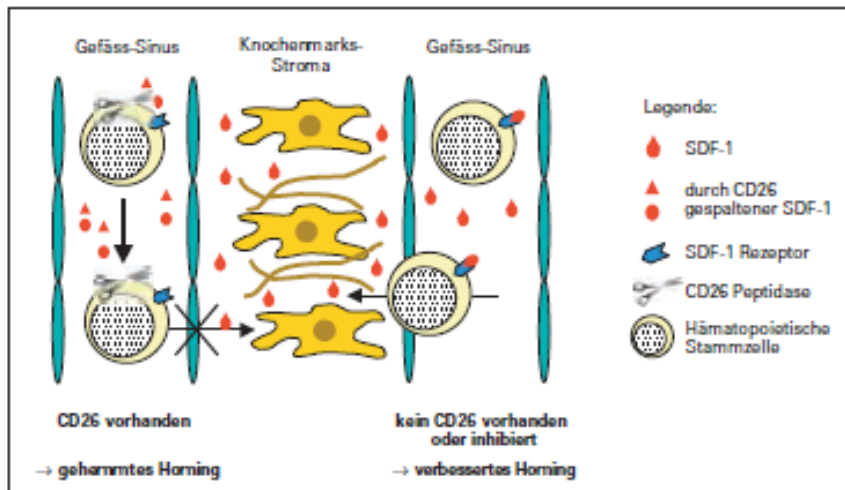


Abb. 15: Modulation des Homings durch SDF-1 (In-)Aktivierung (203)

1.4.2. Interaktion von CD26 mit G-CSF – Stammzellmobilisation

Der Mechanismus der Mobilisation von Stammzellen beruht auf komplexen Interaktionen zwischen hämatopoetischen Vorläuferzellen, mesenchymalen Zellen, extrazellulärer Matrix im Knochenmark und neutrophilen Granulozyten (204,205). Ein wichtiger Signalweg der G-CSF-abhängigen Mobilisierung scheint hierbei die Unterbrechung der SDF-1/CXCR4 Kaskade zu sein, der genaue Mechanismus ist jedoch noch weitgehend unklar (siehe Abb.16). Im Knochenmark sind neben Endothelzellen vor allem Osteoblasten die Hauptquelle für CXCR12; Semerad et al fanden heraus, dass unter G-CSF Behandlung bei Mäusen die Osteoblastenaktivität stark vermindert ist, obgleich der G-CSF –Rezeptor nicht auf Osteoblasten exprimiert wird (206). Eine indirekte G-CSF induzierte Hemmung der Blastenaktivität durch Herunterregulation von CXCR12 wird vermutet. Auch Petit et al stellten einen Abfall des SDF-1 Spiegels nach G-CSF-Gabe fest, dabei korrelierte das Ausmaß der CXCR12 Verringerung gut mit der Menge an mobilisierten Stammzellen (85). Wie oben beschrieben kann CD26 durch seine Peptidaseaktivität ebenfalls CXCR12 inaktivieren. Christopherson et al stellten Untersuchungen bezüglich einer Interaktion zwischen CD26 und G-CSF an und konnten zeigen, dass es nach G-CSF Behandlung in vitro zu einem signifikanten Anstieg der Expression von CD26 auf CD34+/CD38+ Zellen kommt (200). In vivo Studien der gleichen Arbeitsgruppe

ergaben, dass unter CD26 Inhibition (partiell durch Diprotin A oder vollständig durch Genablation) und gleichzeitiger Behandlung mit G-CSF die Zahl der Progenitorzellen im peripheren Blut drastisch abnimmt, das Mobilisationspotential nach 2-tägiger G-CSF Gabe dem unbehandelten Tiere entspricht (207,208).

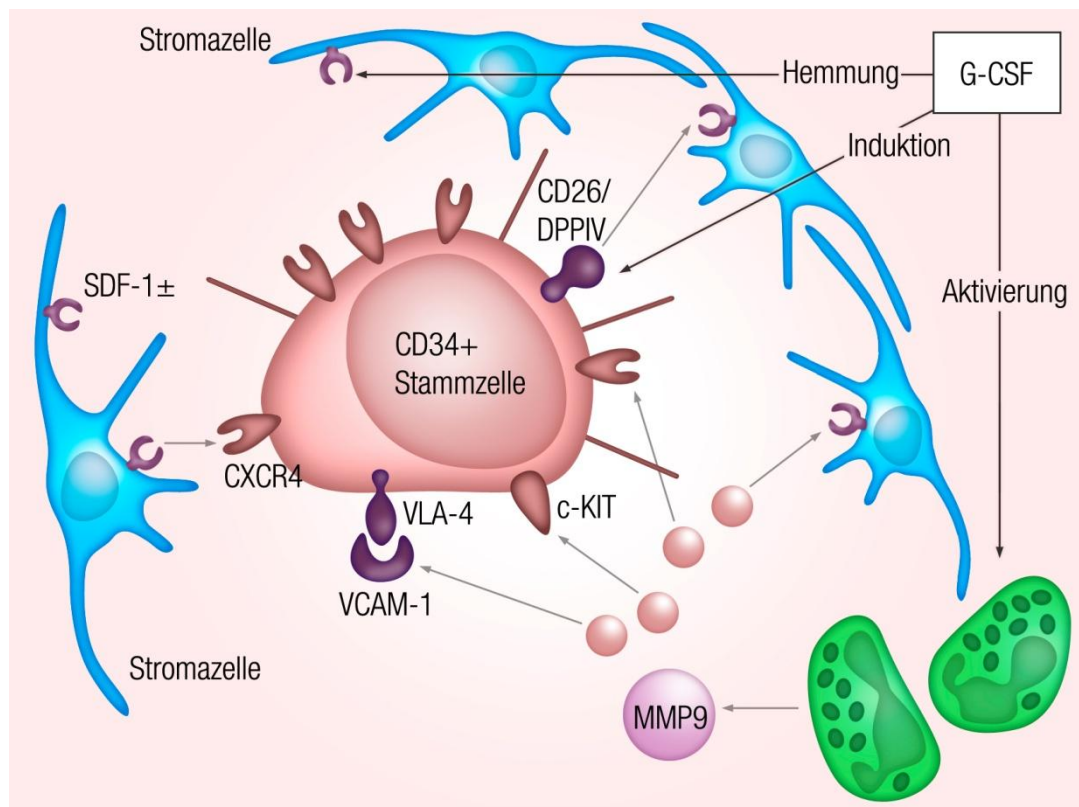


Abb. 16: Mögliche Interaktionskaskade von G-CSF und CD26 (205a)

1.5. Fragestellung der Arbeit

Im Hinblick auf die o.g. Forschungsergebnisse zeigt sich die Inhibition der Dipeptidylpeptidase IV in Kombination mit G-CSF Gabe als Perspektive in Hinblick auf die Therapie mittels Stammzellmobilisation bei ischämischer Herzmuskelerkrankung.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, bei akutem Myokardinfarkt mittels LAD-Ligation am Mausmodell die Kombination der beiden stammzelltherapeutischen Therapieansätze hinsichtlich folgender Fragestellungen zu untersuchen:

- Wirkt sich eine mehrtägige G-CSF - Behandlung nach akutem Myokardinfarkt bei CD26^{-/-} Tieren positiv auf die Mortalität und die Hämodynamik der Mäuse im Vergleich zu unbehandelten Tieren aus?
- Kommt es zu einer gesteigerten Stammzellmobilisation bzw. Homing von Zellen in das Knochenmark, periphere Blut, Herzgewebe und wenn ja, welche Populationen von Stammzellen?
- Hat die medikamentöse Behandlung der Knock-Out-Tiere einen Einfluss auf das kardiale Remodelling nach akutem Myokardinfarkt?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material und Geräte

2.1.1. Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel

Alle Chemikalien wurden in p.A.-Qualität (von höchstem Reinheitsgrad) bezogen, sofern nicht explizit anders vermerkt.

Aqua ad injectabilia	B Braun, Melsungen
Ethanol 75 %	Roth, Karlsruhe
Enzymlösung	Millar Instruments, Houston
Formalin (Formaldehyd 4%)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid 0,9%	Delta select, Pfullingen
PBS	Gibco, Karlsruhe

2.1.2. Allgemeine Laborgeräte

Hera freeze Gefrierschrank	Heraeus,
Liebherr comfort Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Biberach
Liebherr premium Kühlschranks 4°C	Liebherr, Biberach
Rundschüttler Certomat K	Certomat K Braun, Melsungen
Waage Scout pro 400	Ohaus, Giessen
Eppendorf Zentrifuge 5415	Eppendorf
Multifuge3 L-R	Heraeus

2.1.3. Spezielle Materialien

2.1.3.1 Operationszubehör

Braunol®- Lösung	B Braun, Melsungen
Dreieckige Saugtupfer unsteril (SUGI®)	Kettenbach Medical, Eschenburg
Chirurgisches Nahtmaterial (Ethibond excel®, Prolene®)	Ethicon, Norderstedt
Chirurgisches Operationsbesteck	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Haushaltsfaden cotton	Gütermann, Gutach
Leukoplast hospital®	BSN medical, Hamburg
Microlance 3 ®-Einmal-Injektions-Kanülen Größe 0,9 mm x 40 mm und 0,3 mm x 13 mm	Becton Dickinson, Heidelberg
Schutzhandschuhe unsteril (sempercare®)	Semperit, Wien, Österreich
Spritzen zu 1 ml (BD plastipak®)	Becton Dickinson, Heidelberg
Tupfer steril (Pagasling®)	Hartmann, Heidelberg
Zellstoff- Ecken (Zelletten®)	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf
OP- Mikroskop Stemi® 2000	Carl Zeiss, Jena

Mouse-Ventilator Minivent® 845	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Kaltlichtlampe/Quelle KL 1500	Opto, Gräfelfing
Wärmeplatte mit Rektalkatheter	FMI, Seeheim
TKM-0902	
Mehrzweckgefäß mit Schnappdeckel	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.3.2. Hämodynamik

Millar Tip-Katheter (1.4 French)	Millar Instruments, Houston
Millar Aria Pressure-Volume-Konductance System	Millar Instruments, Houston

2.1.3.3. Durchlusszytometrie

2.1.3.3.1 Materialien

Eppendorf-Cups 0,5ml/ 1,5ml/ 2ml	Eppendorf
Eppendorf-Pipetten 0,1µl – 2,5µl / 2µl - 20µl / 20µl - 200µl / 200µl - 1000µl	Eppendorf
Zugehörige Pipettenspitzen	Eppendorf
Spritzen 1ml/ 2ml (BD plastipak®)	Becton Dickinson, Heidelberg
Cellstar TC-Tube steril 14 ml	Greiner bio-one
Cryotubes TM Vials	Nunc, Dänemark
Petrischale Steriplan	Roth, Karlsruhe

BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma, St.Louis
Histopaque	Sigma-Altrich, Runnymede
Collagenase IV	Gibco, Berlin
Durchflusszytometrie-Röhrchen	Beckman Coulter, Fullerton
Sheath-Fluid	Beckmann Coulter, Fullerton
Clenz-Reinigungslösung	Beckman Coulter, Fullerton
Durchflusszytometer Coulter Epics XL-MCL®	Beckman Coulter, Fullerton

2.1.3.3.2 Antikörper

Isotype Control R-PE IgG 2a κ	BD Pharmingen, Heidelberg
Isotype Control FITC Rat-IgG 2a	BD Pharmingen, Heidelberg
Isotype Control PerCP Rat-IgG 2b	BD Pharmingen, Heidelberg
CD31 R-PE Rat-IgG 2b	BD Pharmingen, Heidelberg
CD34 FITC	eBiosciences
CD34 FITC Rat-IgG 2a	BD Pharmingen, Heidelberg
CD34 R-PE Rat IgG 2b	BD Pharmingen, Heidelberg
CD26 FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
CD45 PerCP Rat-IgG 2b	BD Pharmingen, Heidelberg
Flk-1 R-PE Rat-IgG 2b	BD Pharmingen, Heidelberg
c-kit R-PE Rat-IgG 2b	BD Pharmingen, Heidelberg
CXCR4 R-PE Rat-IgG 2b	BD Pharmingen, Heidelberg

Sca-1	R-PE Rat-IgG 2b	BD Pharmingen, Heidelberg
-------	-----------------	---------------------------

2.1.3.4. Histologie

Eosin		BD Pharmingen, Heidelberg
-------	--	---------------------------

Hämatoxylin		BD Pharmingen, Heidelberg
-------------	--	---------------------------

Masson		BD Pharmingen, Heidelberg
--------	--	---------------------------

Trichrom		BD Pharmingen, Heidelberg
----------	--	---------------------------

CD31		BD Pharmingen, Heidelberg
------	--	---------------------------

CD45		BD Pharmingen, Heidelberg
------	--	---------------------------

CD34		BD Pharmingen, Heidelberg
------	--	---------------------------

BrdU		BD Pharmingen, Heidelberg
------	--	---------------------------

Mikroskop Axiovert 200		Carl Zeiss
------------------------	--	------------

Mikroskop- Photokamera Axio Cam HRc		Carl Zeiss
-------------------------------------	--	------------

2.1.4. Pharmaka

Bromodeoxyuridin (BrdU Solution®)		BD Pharmingen, Heidelberg
-----------------------------------	--	---------------------------

G-CSF		Amgen GmbH, München
-------	--	---------------------

Dexpanthenol (Bepanthen® Augensalbe)		Roche, Grenzach-Wyhlen
--------------------------------------	--	------------------------

Heparin-Na® 25000 iE		B Braun, Melsungen
----------------------	--	--------------------

Ketaminhydrochlorid		Inresa, Freiburg
---------------------	--	------------------

(Ketamin-Inresa® 5%)

Thiopental-Na (Trapanal® 0,5 g)

ALTANA, Konstanz

Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%)

Bayer, Leverkusen

2.1.5. Hard- und Software

Adobe Photoshop 7.0

Adobe, San Jose

Axio Vision V4.3

Carl Zeiss, Jena

Dell Desktop PC Optiplex GX 260

Dell, Round Rock

HSE Isoheart

Hugo Sachs Elektronik,

March-Hugstetten

MPCU2PV.exe

Hugo Sachs Elektronik,

March-Hugstetten

PVAN 2.9.

Millar Instruments, Houston

2.1.6. Versuchstiere, Tierhaltung und Tierversuchsanträge

Die Versuche wurden an 8 - 12 Wochen alten Wildtyp-Mäusen des Stammes C57BL/6 mit einem Körpergewicht von 20 bis 25 g (Charles River, Sulzfeld), sowie an CD26^{-/-} Mäusen (Novo Nordisk Dänemark/ Centre d'Immunologie de Marseille Luminy – INSERM, Frankreich) selben Alters und Gewichts durchgeführt. Bezüglich der Generierung des CD26-Knock-Out siehe Abbildung 17.

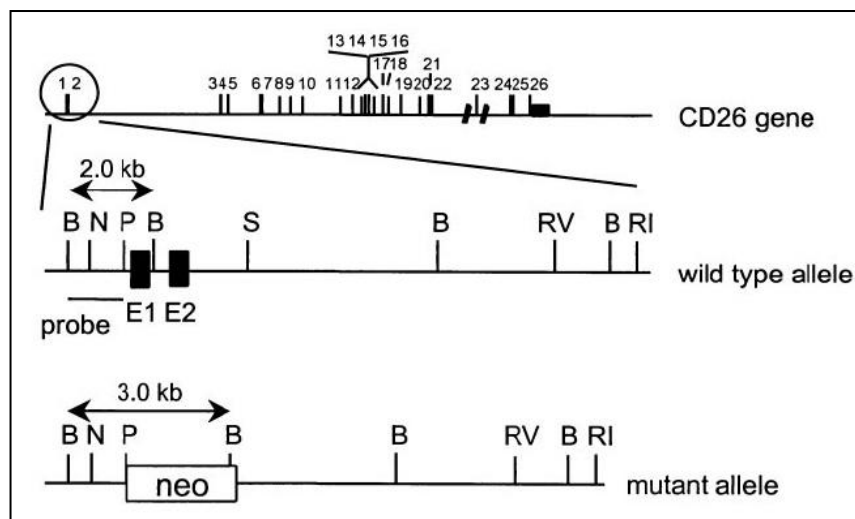


Abb. 17 : CD26 Knock Out : Deletion von Exon 1 und 2 durch homologe Rekombination (186)

Von den CD26-Knock-Out Tieren wurden 5 Paare erworben und die Zucht im S2-Labor der Medizinischen Klinik 1 und 2, Klinikum Großhadern, LMU, sowie im Institut für Chirurgische Forschung (ICF), Klinikum Großhadern, LMU, von zuchterfahrenem Tierpflegepersonal weitergeführt.

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in den Tierställen der oben genannten Institutionen.

Die Käfige wurden mit zwei bis vier Mäusen besetzt, der Tag- Nachtrhythmus lag immer bei 12 Stunden. Die Luftfeuchtigkeit betrug 55%, der Raum war konstant auf 24°C temperiert.

Die Tiere erhielten pelletiertes Futter (Mäuse- Rattenstandarddiät) sowie steriles Wasser ad libitum über Flaschen. Die Umsetzung und Autoklavierung der Käfige erfolgte einmal die Woche.

Die Tierexperimente an der Maus wurden ordnungsgemäß entsprechend den Vorschriften der Tierschutzverordnung durchgeführt. Die Versuchsreihen wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ: 209.1/211-2531-117/02)

2.2. Methoden

2.2.1. Versuchsaufbau

Das Grundprinzip der gesamten Versuchsreihe beruhte auf der Induktion eines Myokardinfarkts mittels Ligation der linken Koronararterie (LAD) an Tag 0.

Für die Daten im Hinblick auf Hämodynamik und Histologie wurden die operierten Tiere für 6 Tage mit G-CSF, bzw. mit einer NaCl 0,9% Lösung behandelt und je nach Gruppe entweder an Tag 6 oder an Tag 30 Herzkathetermessungen durchgeführt, sowie die Herzen zur feingeweblichen Untersuchung entnommen.

Für die Durchflusszytometrie von Blut und Knochenmark wurden die entsprechenden Gruppen nach Operation ebenfalls für sechs Tage mit G-CSF bzw. Kochsalzlösung behandelt und an Tag 6 Proben der zu analysierenden Bestandteile gewonnen.

Die kardiale durchflusszytometrische Untersuchung wurde mit Focus auf das Kurzzeithoming bereits an Tag 2 nach Infarkt durchgeführt, die Injektion von G-CSF bzw. NaCl-Lösung erfolgte dementsprechend für zwei Tage, dann wurden die Herzen zur weiteren Aufbereitung entnommen. (siehe Abb. 18 und 19)



Abb. 18 : Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

	Name der Gruppe	Infarkt	G-CSF (d 0-5)	Hämodynamik /Histologie Tag 6	Hämodynamik /Histologie Tag 30
1	C57BL/6 MI+G-CSF (+ BrdU) d6	Ja	ja	Ja	Nein
2	C57BL/6 MI +G-CSF d30	Ja	ja	Nein	Ja
3	C57BL/6 MI (+BrdU) d6	Ja	nein	Ja	Nein
4	C57BL/6 MI d30	Ja	nein	Nein	Ja
5	CD 26 -/- MI + G-CSF (+ BrdU) d6	Ja	ja	Ja	Nein
6	CD26 -/- MI + G-CSF d30	Ja	ja	Nein	Ja
7	CD26 -/- MI d 30	Ja	nein	Nein	Ja

Abb. 19: Übersicht Hämodynamik- / Histologiegruppen

2.2.2. Mausmodell

2.2.2.1. Infarktinduzierung

Nach Entnahme des Versuchstieres aus dem Käfig wurde zunächst die Narkose eingeleitet. Diese bestand aus einer intraperitonealen Kombinationsinjektion aus 100 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketaminhydrochlorid und 5 mg/kg KG Xylazinhydrochlorid. Die Phase der chirurgischen Toleranz trat nach ca. 3-5 Minuten ein und hielt ungefähr eine Stunde. Bei längerer Versuchsdauer wurde jeweils nach Bedarf nachdosiert (Kombinationsinjektion).

Nach Wirkungseintritt der Narkose wurde die Maus mit dem Rücken auf eine selbstregulierende Wärmeplatte gelegt und die Extremitäten mit Leukoplaststreifen auf der Wärmeplatte befestigt, sowie der Oberkiefer mit einem um die Platte gespannten Gummiband fixiert.

Anschließend wurde mittels eines ca. 1 cm langen medianen Hautschnitts am Hals ein Zugang zur Trachea geschaffen und diese dargestellt. Der Unterkiefer wurde nun mittels gebogener Pinzette vorsichtig angehoben und der Tubus in Form einer stumpfen Metallkanüle (19 Gauge) unter direkter Sicht auf die Luftröhre in diese eingeführt (siehe Abb.20). Am kraniale Ende der Kanüle befand sich, über einen Gummischlauch miteinander verbunden, das Volumen -gesteuerte Beatmungsgerät. Die Beatmung erfolgte nun kontinuierlich mit einer Frequenz von 150 Zügen pro Minute und einem Volumen von ungefähr 200 μ l.

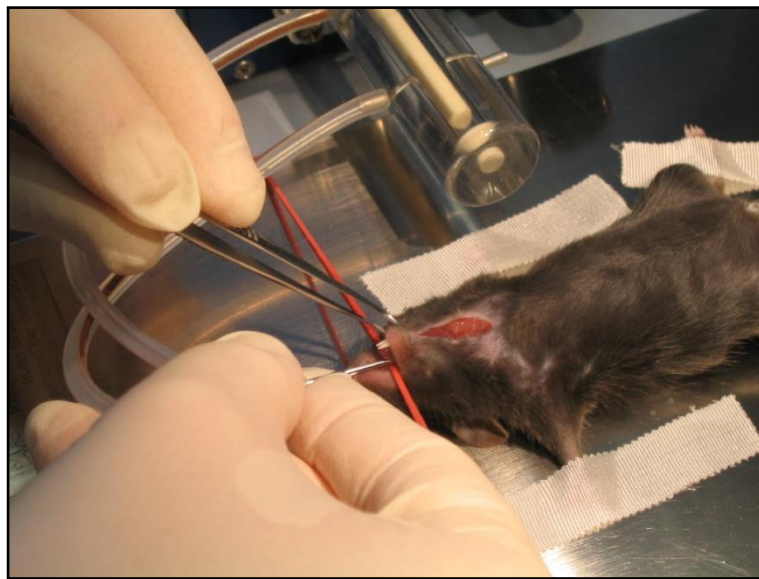


Abb.20 : Intubation des Tieres

Nach Kontrolle der korrekten Lage (seitengleiche und regelmäßige Atemexkursion) und sorgfältigem Fixieren des Tubus wurde die Hautinzision mittels U-Naht (5-0 Ethibondfaden) wieder verschlossen. Anschließend wurde zur Kontrolle und Regulation der Körpertemperatur eine Rektalsonde in den Anus der Maus eingeführt, die durch ein Rückkopplungssystem für eine relativ konstante Kerntemperatur von 37,5° C sorgte. Mit einer Schere wurde nun das Fell im gesamten Thoraxbereich weitestgehend entfernt und ein diagonal von der linken Axillarlinie (Höhe 3 Rippe) ausgehender ca. 2 cm langer Hautschnitt gesetzt. Nach Durchtrennung der darunter liegenden Schichten der Mm. Pectorales major und minor konnte der zweite Interkostalraum links aufgesucht werden. Von diesem Zeitpunkt an wurden alle weiteren Operationsschritte unter dem Mikroskop durchgeführt. Mit Hilfe der Mikroschere erfolgte zunächst die Eröffnung des ICR, dabei wurde die

Zwischenrippenmuskulatur sehr vorsichtig auseinanderpräpariert um eine Verletzung des Herzens oder des linken Lungenlappens zu vermeiden. Die zweimalige Umstechung der zweiten und dritten Rippe mit 5-0 Ethibond-Naht sowie die Aufspannung und Fixierung der Fadenenden im Sinne eines Rippenspreizers ermöglichte einen freien Zugang zum offenen Herzen. Das Perikard wurde nun stumpf durchtrennt um dann am freiliegenden Herzen die LAD (Left Anterior Descendens) aufzusuchen (siehe Abb.21). Nach Lokalisierung wurde das Gefäß ungefähr 2 mm unterhalb des linken Herzohres mit einer 8-0 Prolene-Nadel-Faden-Kombination umstochen und durch mehrmaliges akkurates Verknoten des Fadens ligiert (siehe Abb.22).

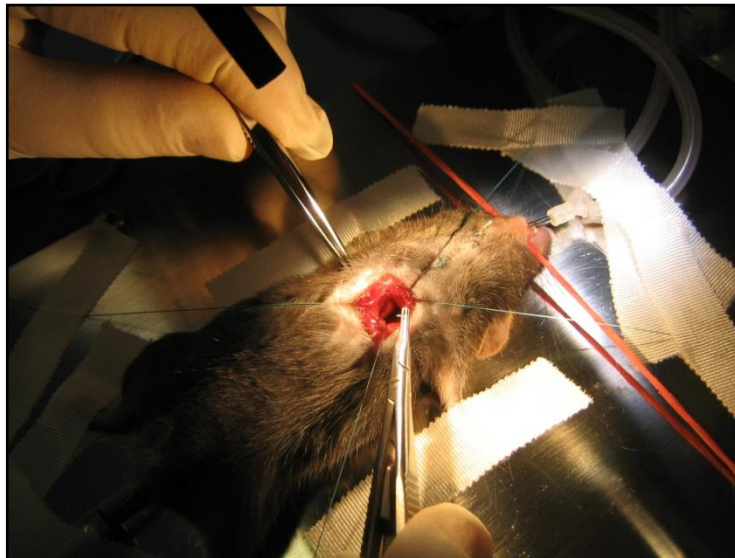


Abbildung 21: Situs nach Thoraxeröffnung

Als sicheres Zeichen einer korrekten Ligation zeigte sich eine deutliche Entfärbung des linksventrikulären Myokards der Koronararterie (siehe Abb. 23). Nach sorgfältiger Blutstillung konnten die „Aufspreizfäden“ des Thorax wieder entfernt und die Thoraxmuskulatur in durchgehender Nahttechnik mit 5-0 Ethibond adaptiert werden. Vor Verknotung der Naht wurde das Beatmungsvolumen kurzfristig auf ca 220 μ l erhöht um ein optimales Anlegen der Lunge an die Thoraxwand zu begünstigen. Anschließend wurden zunächst die Muskelfaszien, dann die Haut mit identischer Technik und –material vernäht, dabei wurde jede Gewebeschicht nach

Wundverschluß mit Braunollösung desinfiziert um einer bakteriellen Infektion vorzubeugen.

Die Extubation erfolgte sobald die Maus Aufwachsymptome, wie Schnurrhaarzucken, zeigte. Nach Kontrolle der selbstständigen Atmung wurde das Tier dann in eine mit Zellstoff ausgelegte Box gelegt und diese bis zum Rücktransport in den Tierstall für ca. eine halbe Stunde unter eine Wärmelampe gestellt. Die Gesamtdauer der Operation betrug 30 - 45 Minuten. Zum Ausschluss operativer Einflüsse wurden nur Tiere in die statistischen Analysen einbezogen, welche die Operation mindestens 24 Stunden überlebten.

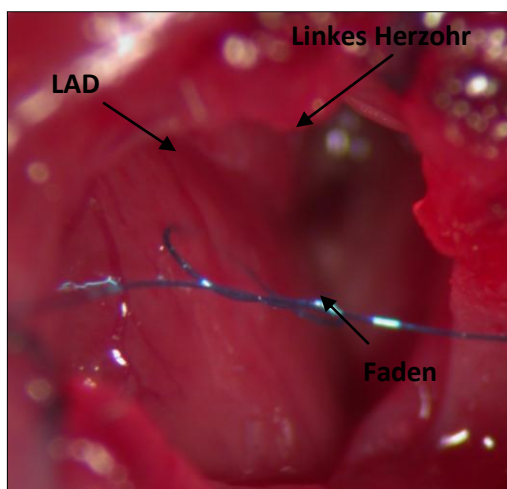


Abb. 22: Blick auf den linken Ventrikel
vor Ligation der LAD (49a)

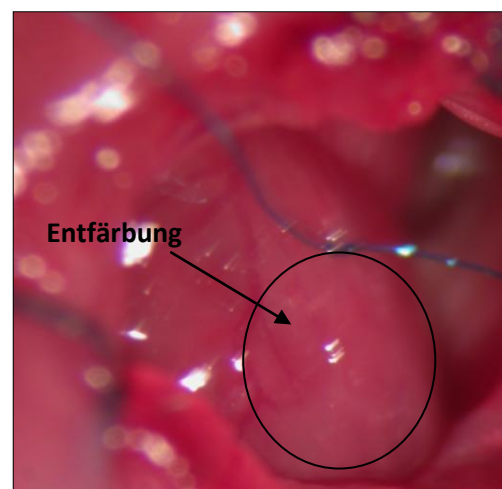


Abb.23: **nach** LAD- Ligation (49a)

2.2.2.2. Gabe von G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor) und BrdU (Bromodeoxyuridin)

Den Tieren der G-CSF-Gruppen wurden jeweils 5-10 Minuten nach Operationsende 100 µg/kg KG G-CSF intraperitoneal verabreicht. Es folgten je eine tägliche G-CSF-Injektion (ebenfalls 100 µg/kg KG) für weitere 5 Tage.

Die Tiere der Kontrollgruppen wurden über den gleichen Zeitraum mit einer Lösung bestehend aus 50 µl isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) behandelt. Des Weiteren wurde allen Tieren der Tag-6-Gruppen an Tag 1 bis 5 je eine Dosis BrdU (50 µg/Kg KG) intraperitoneal verabreicht.

2.2.2.3. Hämodynamische Messungen mittels Herzkatheter

2.2.2.3.1. Grundprinzip der *Conductance Methode*

Die *Conductance-Methode*, von Baan et al. Mitte der 80er entwickelt, ermöglicht die zeitgleiche Ableitung von linksventrikulärem Druck und Volumen. Grundlage hierfür ist die Veränderung der elektrischen Leitfähigkeit des Blutes im Verlauf der Ventrikelaktion (209). Der Katheter mit integriertem Drucksensor (Millar Tip-Katheter 1.4 French) wird so positioniert, dass die distale Elektrode in der Herzspitze des linken Ventrikels, die proximale direkt unter der Aortenklappe zu liegen kommt (siehe Abb. 24).

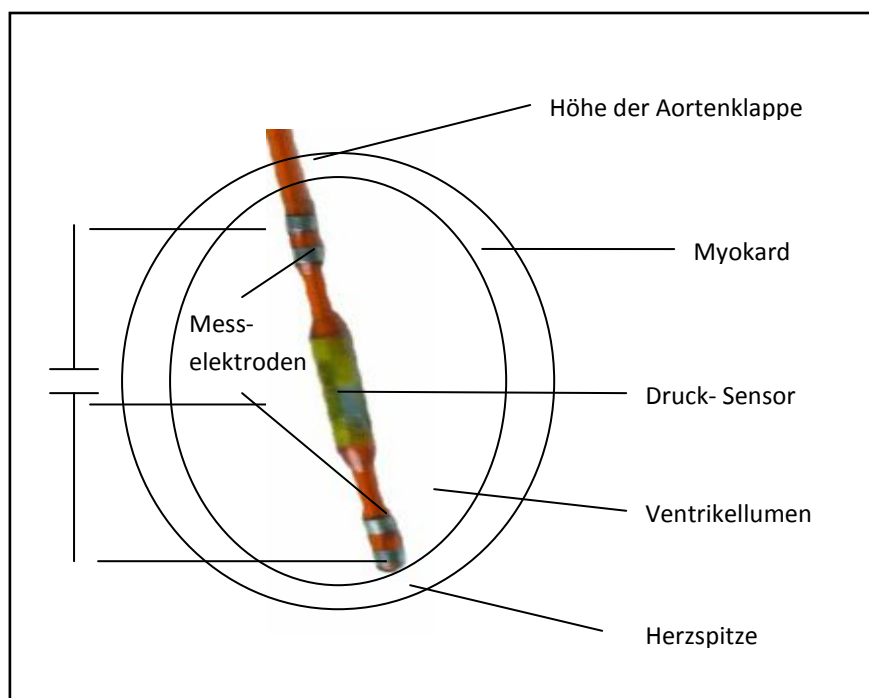


Abb.24: Veranschaulichung der Katheterlage im linken Ventrikel (49a)

Die Leitfähigkeit (Conductance) $G(t)$ des durch Wechselstrom induzierten elektrischen Feldes zwischen den beiden Elektroden ändert sich mit Zu- oder Abnahme des intraluminalen Blutvolumens $V(t)$. Diese Fluktuationen werden gemessen und mit folgender Gleichung das linksventrikuläre Volumen berechnet:

$$V(t) = (1/\alpha) \times (L^2/\sigma_b) \times (G(t) - G(p))$$

$V(t)$: zeitabhängiges ventrikuläres Volumen

α : Korrekturfaktor: Schlagvolumen_{Conductance} / Schlagvolumen_{Referenzmethode}

L : Elektrodendistanz

σ_b : spezifische Leitfähigkeit des Blutes

$G(t)$: Gesamtleitfähigkeit

$G(p)$: Leitfähigkeit des umliegenden Gewebes (parallele Conductance)

Da die Messelektroden nur Leitfähigkeits-Veränderungen, registrieren, ohne dabei die Beschaffenheit der unterschiedlichen Strukturen zu berücksichtigen, wird die Leitfähigkeit des umgebenden Gewebes (parallele Conductance $G(p)$) und das daraus resultierende Volumen vom Katheter mitgemessen und muss nachträglich separat berechnet und vom Gesamtvolumen subtrahiert werden. Dies wurde methodisch mittels Injektion von 10 µl hypersaliner Kochsalzlösung (4,5 %) über einen Jugularis–Katheter und zeitgleicher Aufzeichnung der Volumenveränderung bewerkstelligt.

Das Volumen $V(p)$ der parallelen Leitfähigkeit wurde dann geometrisch durch den Schnittpunkt der Verlaufsggeraden „Salineinjektionsvolumen“ mit der Nullgeraden, die den Zustand der leeren Herzkammer (Enddiastolisches Volumen (V_{ed}) = Endsystolisches Volumen (V_{es})) darstellt, bestimmt (siehe Abb.25).

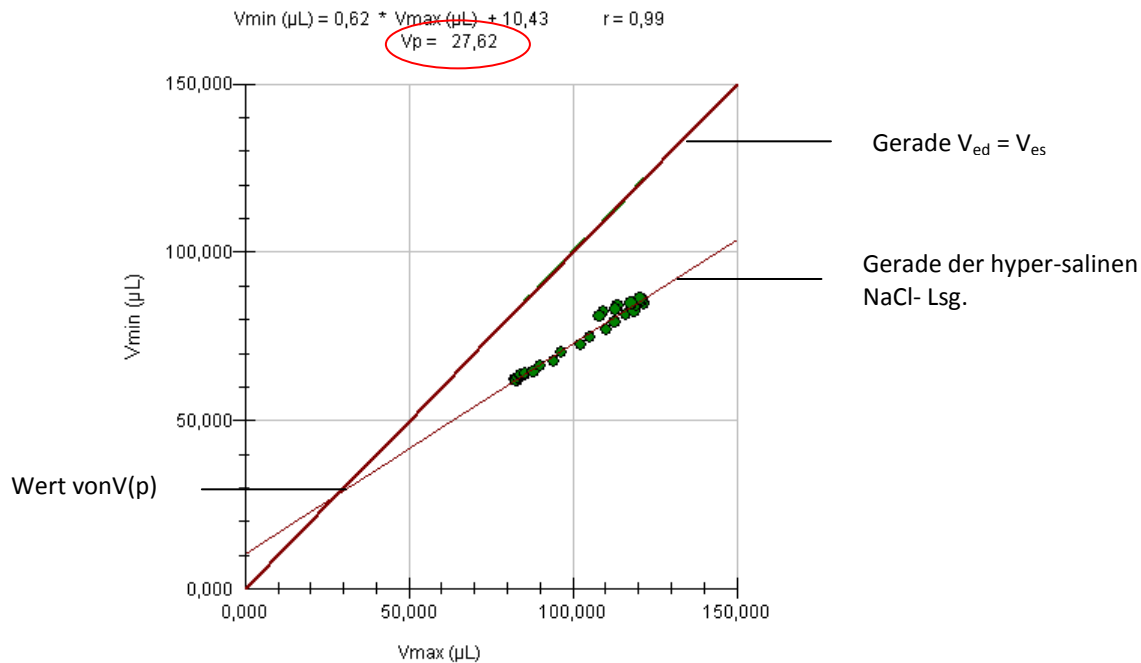


Abb.25 : Berechnung von $V(p)$ mittels Geradenschnitt (49a)

2.2.2.3.2. Vena-cava-Okklusion

Die Technik der Vena-cava-Okklusion wurde angewandt, um die endsystolische Elastanz (E_{es}) als vorlastunabhängiges Maß für die Kontraktilität des linken Ventrikels zu berechnen.

Durch Unterbrechung des venösen Rückstroms zum Herzen (zur Technik siehe 2.2.3.3.4.) nimmt die Vorlast, das diastolische Füllungsvolumen ab und es kommt zur Linksverschiebung und Verkleinerung der Druck-Volumen-Schleifen (siehe Abb. 26 und 27).

Legt man eine Linie durch die endsystolischen Punkte, ergibt sich idealerweise eine Gerade, welche die endsystolische Druck-Volumen-Beziehung (ESPVR) darstellt und deren Steigung E_{es} entspricht. Je höher die Kontraktilität, umso steiler erscheint die Gerade.

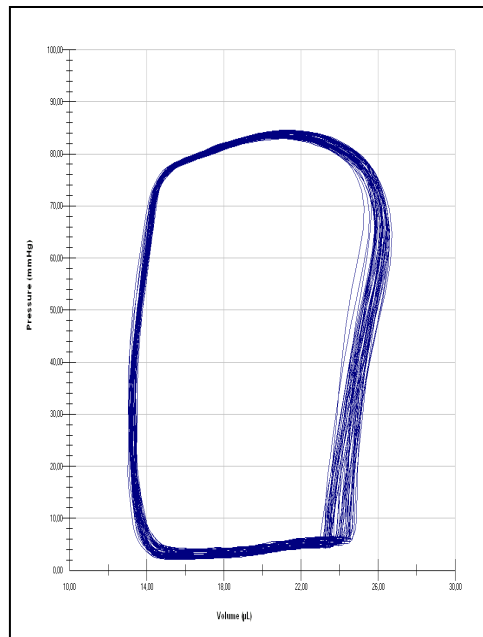


Abb.26: Druck-Volumen-Schleife einer gesunden Maus im Ruhezustand (49a)

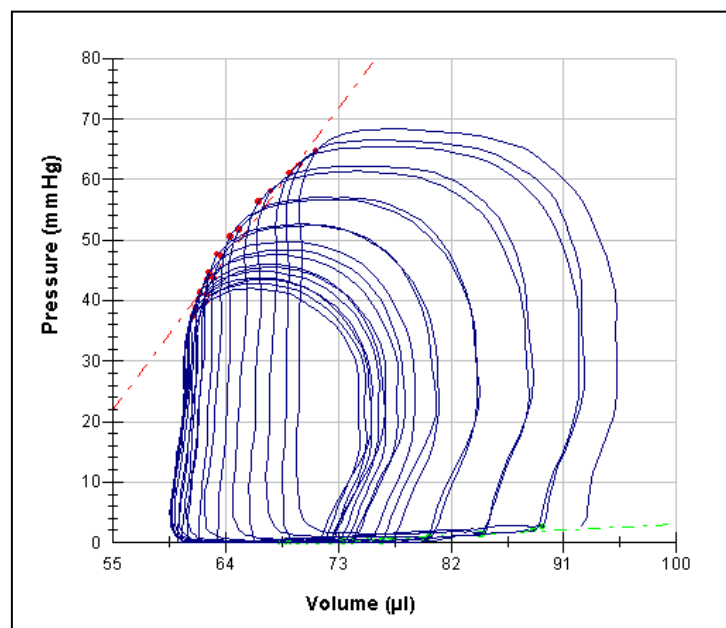


Abb.27: während Vena-Cava-Okklusion; die Steigung der Geraden entspricht der endsyst. Elastanz (49a)

2.2.2.3.3. Ablauf der Messung

Je nach Versuchsprotokoll wurde die Untersuchung am Tag 6 bzw. Tag 30 nach Myokardinfarkt durchgeführt. Die Narkose wurde mit 100mg/kg/KG Trapanal

intraperitoneal eingeleitet und analog dem Vorgehen bei der Operation (siehe 2.2.2.1.) das Tier auf einer Wärmeplatte fixiert sowie intubiert. Unter mikroskopischer Vergrößerung erfolgte nun mittels zweier stumpfer Pinzetten die Darstellung der rechten Carotisscheide und der darin verlaufenden Arteria carotis communis (ACC). Die unmittelbare Nähe des Nervus Vagus erforderte bei der Präparation besondere Umsicht, da eine Verletzung dessen mit hämodynamischen Veränderungen einhergeht. Zur besseren Darstellung der ACC wurde unter dem kranialen Ende des freiliegenden Gefäßes nun ein Zügel (Cottonfaden) angebracht, locker verknötet und mit leichter Spannung fixiert. Durch den hieraus resultierenden Blutrückstau kommt es zu einer Erweiterung des Arterien durchmessers. Um mögliche Blutungen schnell unter Kontrolle zu bringen, wurde ein zweiter Faden spannungsfrei um das kaudale Ende geschlungen. Während des gesamten Eingriffs wurde das Operationsgebiet mehrmals mit isotoner Kochsalzlösung gespült um einer Elastizitätsminderung der Gefäßwand und somit Rupturgefahr vorzubeugen. Verbesserte Stabilität beim Einführen des Katheters wurde durch einen Metallspanner gewährleistet, der unter die ACC geschoben wurde. Anschließend erfolgte die Gefäßpunktion mittels einer kleinen Kanüle und das vorsichtige Einbringen des Katheters in das Lumen. Unter ständiger Kontrolle der Druckkurve am Monitor wurde der Katheter die Aorta ascendens entlang durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel vorgeschoben und solange manipuliert, bis eine optimale Einstellung erreicht war. Nach Stabilisierung der Hämodynamik wurden die Grundwerte (Basalwerte) der Herzleistung im Verlauf über etwa fünf Minuten beobachtet und gespeichert.

Zur späteren Bestimmung des Realvolumens musste jeweils am Ende der Messung die rechte Vena jugularis interna aufgesucht und mehrmals Injektionen (ca 10µl Bolus hypersaliner Kochsalzlösung 4,5% NaCl) mittels Katheter vorgenommen und aufgezeichnet werden.

Für die Vena-Cava-Okklusion wurde das Abdomen der Maus mittels einer Schere eröffnet. Unter Sicht wurde die Leber zur Seite mobilisiert, um die Vena cava inferior exponieren zu können. Nun wurde mit der Pinzette für wenige Sekunden die Vena cava inferior abgeklemmt und anschließend wiedereröffnet. Auch hier wurden mehrere Messdaten hintereinander erhoben.

2.2.2.3.4. Aufzeichnung und Messparameter

Der Katheter (Millar Tip-Katheter 1.4 French) war durch eine Druckleitung mit einem Druckaufnehmer (Millar ARIA) verbunden, dessen Signale wiederum über einen ZweiKanal-Brückenverstärker (HSE) an die Computermessapparatur (Dell) gesendet wurden. Die übermittelten Daten wurden kontinuierlich mittels des Programms HSE Isoheart aufgezeichnet und mit Hilfe der Software Millar PVAN 2.9 im Hinblick auf folgende Parameter ausgewertet:

- **Herzfrequenz** (HF) in 1/min
- **Maximaler Blutdruck** (LVP) in mmHg
- **Minimaler Blutdruck** (MinP) in mmHg
- **Endsystolisches Volumen** (ESV) in μl
- **Enddiastolisches Volumen** (EDV) in μl
- **Schlagvolumen** (SV) = $\text{EDV} - \text{ESV}$ (in μl)
- **Ejektionsfraktion** (EF) = $(\text{EDV} - \text{ESV}) / \text{EDV} \times 100$ (in %)
- **Herzminutenvolumen** (HMV; cardiac output) = $\text{HF} \times \text{SV}$ (in $\mu\text{l}/\text{min}$)
- **Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit** (dP/dt_{max}) in mmHg/sec
- **Arterielle Nachlast** (E_a) = $\text{Endsystolischer Druck (P}_{\text{es}}) / \text{SV}$ (in mmHg/ml)

2.2.3. Histologie

2.2.3.1. Herstellung der Paraffinschnitte

Histologie und Immunhistochemie der Herzen wurden in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der LMU München durchgeführt.

Am Ende der hämodynamischen Messung wurden die Tiere durch eine Überdosis des Anästhetikums euthanisiert, anschließend der Thorax eröffnet, die Gefäßhauptstämme durchtrennt und das Herz entnommen. Mit NaCl 0,9%-Spülung wurden die Ventrikel über die Aorta von Blutresten gereinigt und dann für 24 Stunden in einer 4 %-igen Formalin-Lösung bei 4°C fixiert. Am folgenden Tag wurde das Herz in 70%-igen Alkohol umgelagert und durch eine Entwässerungsmaschine geschickt. Abschließend erfolgte die Einbettung des Herzens in Paraffin. Für die histologischen Bestimmungen wurden vom Herzen mit einem Paraffin-Schneidegerät Scheibchen von 4 µm Dicke hergestellt, auf saubere, silanisierte Adhäsions-Objektträger aufgezogen und 24 Stunden bei 37°C getrocknet.

2.2.3.2. Bestimmung der Morphologie

2.2.3.2.1. Infarktgröße

Die Infarktgröße wurde planimetrisch erhoben (siehe Abb.28). Pro Versuchstier wurden mikroskopisch jeweils vier Herzschnitte im Abstand von 2mm von der Herzspitze bis zur Herzbasis ausgewertet. Der prozentuale Infarktanteil ergab sich aus dem Quotienten von infarzierter Fläche (AI) und Gesamtfläche des linken Ventrikels inklusive Septum (LV).

$$\frac{\text{AI in mm}^2}{\text{LV in mm}^2} = \text{I in \%}$$

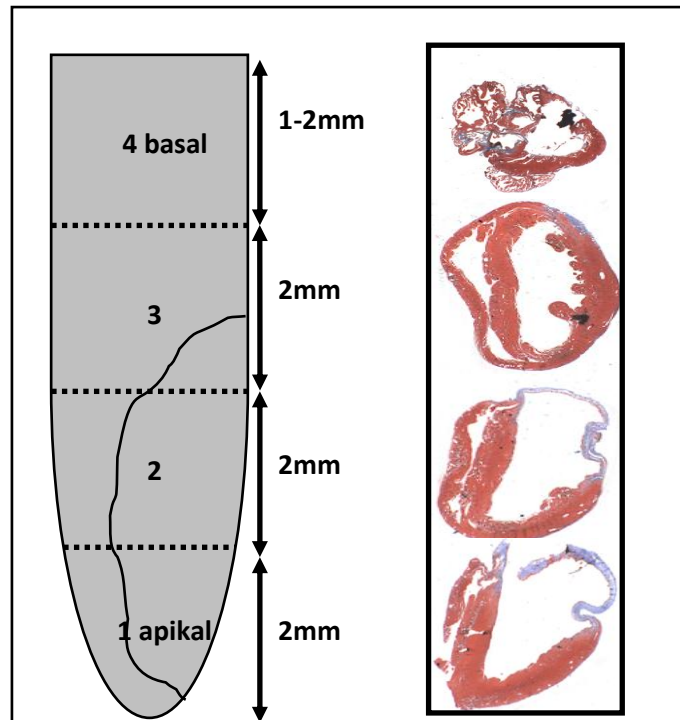


Abb.28 : Schematische Darstellung der Infarktgrößenbestimmung anhand von 4 histologischen Schnitten von der Herzspitze zur Basis (49a)

Um auch die Längsausdehnung des Infarktes zu berücksichtigen, wurde anschließend noch der Quotient aus Längsausdehnung der Infarktfläche und der Gesamtlänge des linken Ventrikels berechnet.

$$\text{Längsausdehnung (Infarktfläche)} = \frac{\text{Längsausdehnung des Infarktareals in mm}}{\text{Gesamtlänger linker Ventrikel in mm}}$$

Dieser Wert wurde mit dem Mittelwert der vier prozentualen Infarktanteile multipliziert. Daraus ergab sich die Infarktgröße in Prozent (bezogen auf den gesamten linken Ventrikel).

2.2.3.2.2. Wand- / Septumdicke und Granulationsgewebe

Die Vermessung der Wanddicken und des Granulationsgewebes wurde mithilfe der Software Axiovision (Vergrößerung 15-fach) durchgeführt. Ausgewertet wurden jeweils die Gewebsschnitte auf Höhe des Papillarmuskels, entsprechend Schicht 2 in Abb.28 in Masson-Trichrom-Färbung. Zunächst teilte man das Infarktgebiet in 5 Sektoren von identischer Größe ein. Innerhalb jedes Segments wurde die Stelle mit der geringsten Wandstärke bestimmt und die Dicke im Lot gemessen. Aus dem Mittelwert der 5 Distanzen ergab sich die Wanddicke im Infarktareal in mm.

Nach selbem Schema erfolgte die Bestimmung der interventrikulären Septumdicke. Der Anteil des Granulationsgewebes im Infarktgebiet wurde nach Ausmessung der Infarktfläche sowie der Nekrosefläche in mm² folgendermaßen berechnet:

$$\text{Granulationsgewebe (in\%)} = \frac{\text{Infarzierte Fläche in mm}^2 - \text{Fläche aller nekrotischen Areale in mm}^2}{\text{Infarzierte Fläche in mm}^2}$$

2.2.3.3. Immunhistochemie

Bei der immunhistochemischen Färbung der Schnitte wurde nach der Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex-Methode (ABC) verfahren.

Nach Herstellung der Gewebeschnitte wie unter 2.2.4.1 beschrieben, wurden diese in Xylol drei Mal für 5 Minuten entparaffinisiert und anschließend in drei Zyklen a 10 Minuten mit 100%igen, 96%- und 70%- Alkohol rehydriert. Anschließend wurde die endogene Peroxidase für 10 Minuten mittels 7,5%-igem Wasserstoffperoxid inaktiviert. Nach Spülung in Aqua dest. und TRIS-Lösung folgte die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern (siehe 2.1.2.) bei Raumtemperatur für eine Stunde. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die gebundenen Primärantikörper für die Lichtmikroskopie mit Hilfe eines sekundären Antikörpers (siehe 2.1.2.), der an einen Komplex aus Avidin und biotinylierter Peroxidase (ABC) gebunden ist, visualisiert. Die spezifische Farbreaktion entsteht hier durch die Reaktion der Peroxidase mit dem in der Färbelösung enthaltenen Aminoethylcarbazol. Zur Beendigung der

Färbung wurden die Objektträger mit Aqua dest. gewaschen, dann die Kernfärbung mit Mayers Hämatoxylin durchgeführt und die Histoschnitte abschließend mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

2.2.3.3.1. BrdU-Färbung

2-Bromo-5-desoxyuridin (BrdU), ein Analogon des Thymidin, wird während der S-Phase des Zellzyklus in die zelluläre DNA integriert und kann immunhistochemisch im Zellkern nachgewiesen werden. BrdU ist ein Marker für Zellproliferation und auf Grund seiner kurzen Bioverfügbarkeit lässt sich schließen, dass sich BrdU+ Zellen zum Zeitpunkt der Injektion im Prozess der Zellteilung befunden haben.

2.2.3.3.2. Ki67-Färbung

Ki67 ist ebenfalls ein Proliferationsmarker und färbt die sogenannte Wachstumsfraktion an. Während des Zellzyklus wird dieses Antigen in der G1-, in der S-, in der G2- und in der M-Phase exprimiert, nicht aber bei ruhenden Zellen in der G0 Phase.

2.2.3.3.3. Anti-CD31 (CD31)

Bei CD31 (PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule 1) handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül, das vor allem in den interzellulären Verbindungen von Endothelzellen in hoher Konzentration vorkommt. PECAM 1 wird, aber deutlich schwächer, auch von Thrombozyten, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und einigen speziellen T-Zell-Populationen exprimiert. Es kommt nicht auf Fibroblasten, Epithelien, Muskelzellen oder anderen Nicht-Gefäßzellen vor. Die Färbung von Gefäßen mit Antikörpern gegen CD31 ist somit eine ideale Methode, um (Neo-) Angiogenese für das menschliche Auge sichtbar zu machen.

2.2.3.3.4. Anti-CD45 (CD45)

Die Tyrosinphosphatase CD45 (L-CA , Leukocyte common antigen, T200), ist ein Transmembranprotein. Es wird auf nahezu allen differenzierten Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert, ausgenommen Erythrozyten und Plasmazellen und fungiert als Pan-Leukozytenmarker.

2.2.4. Durchflusszytometrie

2.2.4.1. Grundprinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie geht auf Wallace Coulter zurück, der das „Coulter-Prinzip“ zur elektronischen Zählung und Größenbestimmung mikroskopischer Partikel erfand und erstmals 1956 einen nichtoptischen Blutkörperchenzählautomaten zum Patent anmeldete (210).

Das Verfahren ermöglicht die quantitative Bestimmung und Klassifizierung von Zellen anhand ihrer Oberflächenproteine. Das Prinzip der Analyse beruht auf der Antigen-Antikörper-Interaktion, die mittels monoklonalen fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wird.

Blut, Knochenmark und Herzgewebe wurden mit dieser Methode auf das Vorhandensein verschiedener Stammzelloberflächenantigene untersucht, was durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Emissionsspektren ermöglicht wurde. Verwendete Farbstoffe waren Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, 515-545 nm), Peridinin Chlorophyll-A-Protein (PerCP, >650 nm) und Phycoerythrin (PE, 564-606 nm).

Die mit oben genannten Stoffen markierten Zellen werden durch einen monochromatischen Laserstrahl angeregt und auf ein höheres Energieniveau angehoben. Durch Emission von Photonen, die mittels eines Photodetektors quantifiziert wird, fallen sie dann wieder auf ihr ursprüngliches Energielevel zurück. Die gemessene Emissionsrate verhält sich proportional zur Menge der gebundenen Antikörper und lässt so Rückschlüsse auf die Oberflächenstruktur zu.

Da sich die Spektren teilweise überschneiden, bzw. eng beieinander liegen, wird für jede Probenreihe eine Kontrolle mit Isotypen (unspezifisch bindende Antikörper der

jeweiligen Spektralfarbe) benötigt. Dies ermöglicht eine Eichung der einzelnen Kanäle, sodass die Zellen sich ganz exakt nach den jeweiligen Oberflächenmolekülen auftrennen lassen.

Die Grundfärbung aller Proben erfolgte mit CD45 (FITC-markiert) und CD34, bzw. CD26 (jeweils PerCP-markiert) sowie mit einem individuellen Stammzellmarker (CD31, c-kit, sca-1, CXCR4, Flk-1) der PE-markiert wurde.

2.2.4.2. Isolierung des Untersuchungsmaterials

2.2.4.2.1. Blut und Knochenmark

Nach Narkotisierung und Lagerung wurde analog zur Intubationseinleitung ein ca. 1cm langer medianer Hautschnitt beginnend an der Unterkieferkante durchgeführt, die beiden Thymuslappen stumpf voneinander gelöst und die darunter liegende Arteria carotis communis grob freipräpariert. Es folgte die Eröffnung des Gefäßes mit der kleinen Operationsschere. Das unmittelbar darauf entströmende Blut wurde mit einer 2ml Spritze aspiriert, in die zur Vermeidung der Gerinnung bereits 155µl Heparin aufgezogen worden waren. Für den nächsten Arbeitsschritt wurde das bereits anämische Tier mit einer Überdosis Trapanal (ca. 400µl i.p.) euthanisiert. An beiden Hinterbeinen wurden nach Hautschnitt an der lateralen Femurkante und Abpräparieren der Muskulatur, die Oberschenkelknochen unterhalb des Schenkelhalses und oberhalb der Kondylen gekappt und entnommen. Jeder Knochen wurde dann mit Ethanol und Papiertüchern von Geweberesten gereinigt und anschließend das darin enthaltene Mark mit PBS-gefüllten Spritzen (4ml pro Femur) und 0,9 mm Ø Kanülen herausgespült, in Röhrchen aufgefangen und mittels Pipette suspendiert. Auf zwei bereits mit 1ml Histopaque gefüllte Zentrifugenröhrchen wurden nun 1ml Blut, bzw. 4ml Knochenmarksuspension mit großer Vorsicht aufpipettiert, ein Vermischen der Phasen musste hier tunlichst vermieden werden um eine präzise Auftrennung der verschiedenen Probenbestandteile zu gewährleisten. Nach 30 Minuten in der Zentrifuge (Bremse 1, Rotationsgeschwindigkeit 1100x/min) zeigten sich in jedem Röhrchen drei Schichten. Die mittlere Phase aus mononukleären Zellen wurde isoliert und in ein frisches Gefäß überführt.

2.2.4.2.2. Herzgewebe

Die Entnahme des Herzens erfolgte wie unter 2.2.3.1. bereits beschrieben. Im Anschluss wurde das Organ retrograd über die Aorta ascendens mehrmals gut mit isotoner Kochsalzlösung durchspült um eine komplette Blutleere zu gewährleisten. In einer Zellkulturschale wurde das Gewebe mit einem Skalpell in kleine Stückchen zerlegt und 6 ml Collagenase-Lösung IV 0,1% hinzu pipettiert. Im Zellkulturschrank erfolgte der Gewebeverdau bei 37°C für 30 Minuten. Anschließend wurde die Lösung fünf Minuten lang mit der 1000µl Pipette resuspendiert, durch ein 40µm Zellsieb in ein 50ml Röhrchen gefiltert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

2.2.4.3. Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

Das weitere Vorgehen war bei den drei verschiedenen Zellproben identisch.

Die Zellsuspension wurde mit PBS auf 6ml Flüssigkeit verdünnt und dann für 10 Minuten bei 800 Umdrehungen/min (Bremse 3) zentrifugiert. Von dem so entstandenen Zellpellet am Boden des Gefäßes wurde die Flüssigphase abpipettiert und erneut bis auf 6 ml mit PBS aufgefüllt. Ein Zentrifugationsschritt mit gleichen Einstellungen folgte, wieder wurde der Überstand entfernt, jedoch diesmal mit 6 ml PBS –BSA 2% (BSA verhindert unspezifische Proteinbindungen) resuspendiert und erneut für 10 Minuten zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift vor der Inkubation wurde das Pellet in einer entsprechenden Menge PBS-BSA2% gelöst (Anzahl der Proben x 50µl PBS-BSA2% + 30 µl PBS-BSA2%). Dann je 50 µl Zellsuspension zu den zwischenzeitlich mit PBS-BSA2% Lösung und den Antikörpern vorbereiteten Eppendorf-Cups zugegeben und für 60 Minuten bei 4° C inkubiert. Das Handling mit den Antikörpern musste soweit wie möglich unter Ausschluss von Licht geschehen, da diese nicht photostabil sind.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden abschließend zwei Waschschriffe mit jeweils 200µl PBS-BSA2% bei 2000 Umdrehungen/min für 5 Minuten vorgenommen. Darauf folgte die Lösung der Pellets in 100µl PBS-BSA2%. Abschließend wurde die entstandene Zellsuspension in bereits vorbereitete Reagenzgläser überführt und mit der enthaltenen Trägersubstanz, ebenfalls PBS-BSA2%, vermischt (Knochenmark: 800µl / Blut u Herz: 400µl)

2.2.4.4. Messung und Analyse der Proben

Als repräsentative Auswahl wurden bei jeder Analyse 10.000 Zellen im Blut, 20.000 Zellen im Knochenmark und 50.000 Zellen im Herzgewebe gemessen. Die Zellsuspension wird aus den Probenröhrchen gesaugt und mit hoher Geschwindigkeit durch eine Stahlkapillare geschossen. Mit der Trägerflüssigkeit wird ein laminarer Hüllstrom erzeugt. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen so stark beschleunigt, dass sie einzeln hintereinander aufgereiht den Analysepunkt erreichen (hydrodynamische Fokussierung). Am Analysepunkt werden die Zellen von einem Argonlaserstrahl der Wellenlänge 488 nm erfasst und über die Lichtstreuung können mit Photodetektoren Größe, Granularität und verschiedene Fluoreszenzen gemessen werden. Das in die Vorwärtsrichtung gestreute Licht bezeichnet man als „*forward light scatter*“. Dieser Parameter dient in erster Linie als Maß für die Größe der Zellen. Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht hängt hauptsächlich von der intrazellulären Granularität ab und wird als „*sideward scatter*“ bezeichnet. Man kann anhand dieser beiden Messungen auf die Identität und Vitalität einzelner Zellpopulationen schließen.

2.2.5. Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden als Einzelwerte oder in ihrer Gesamtheit als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden entsprechend den Anforderungen mit dem ungepaarten Student's t-Test bzw ANOVA-Analyse, gefolgt vom Bonferroni Test ermittelt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen und in den Abbildungen entsprechend gekennzeichnet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Überleben nach 30 Tagen

Um den Einfluss einer Stammzellmobilisation mittels G-CSF in Kombination mit einer DPPIV Depletion zu untersuchen, wurde zunächst das Überleben von infarzierten Wildtyp- und CD26^{-/-}-Mäusen mit und ohne G-CSF Behandlung 30 Tage nach Myokardinfarkt analysiert. Abbildung 29 zeigt das kumulative Überleben G-CSF-behandelter CD26^{-/-} Tiere (CD26^{-/-} + MI + G-CSF; n= 15) verglichen mit G-CSF behandelten Wildtyp-Mäusen (wt+ MI+G-CSF; n=18), unbehandelten CD26^{-/-} Tieren (CD26^{-/-} + MI; n= 11) und unbehandelten Wildtyp-Mäusen (wt + MI; n=15) 30 Tage nach Myokardinfarkt. Die Mortalität war in allen Gruppen zwischen Tag 3 und Tag 5 am höchsten (15 % - 40 %). Als Todesursache konnte bei post mortem entnommenen Herzen häufig eine Ventrikelruptur mit konsekutiver Perikardtamponade nachgewiesen werden. Hinsichtlich des Überlebens zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Überlebenskurve G-CSF behandelter CD26^{-/-} Tiere (73,3 % Überlebende nach 30 Tagen; n=11/15) verglichen mit G-CSF behandelten Wildtyp-Mäusen (55,6 % Überlebende; n=10/18) und den unbehandelten Kontrollgruppen (wt 40 % Überlebende; n=6/15 und CD26^{-/-} 46,6 % Überlebende; n=7/15).

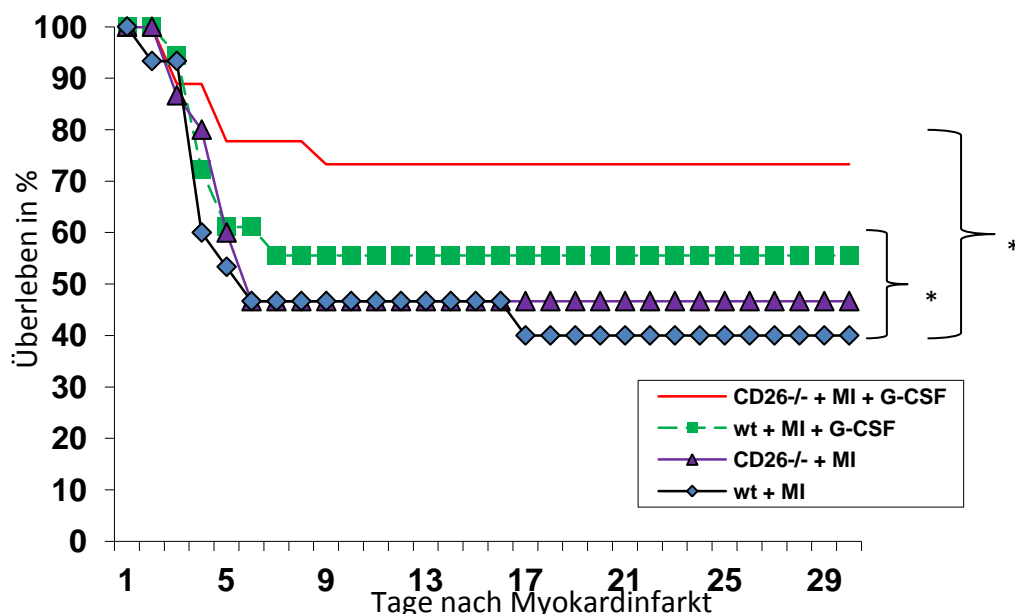


Abb.29: Überleben nach 30 Tagen (230)

3.2. Histologie

3.2.1. Infarktgrößen

Wie im Methodenteil ausführlich beschrieben, wurde an Tag 6, sowie an Tag 30 die Fläche des Infarktareals planimetrisch bestimmt.

6 Tage nach Infarkt (gemessen als Granulationsgewebe + Nekrose) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Die durchschnittliche Infarktfläche betrug bei unbehandelten Wildtyp und CD26^{-/-} Tieren 40,6 % ± 4,0 bzw. 42,7 % ± 1,9, sowie bei G-CSF behandelten Wildtyp- und CD26^{-/-} - Mäusen 42,5 % ± 5,0 bzw. 42,2 % ± 2,9 bezogen auf die Gesamtfläche des linken Ventrikels (siehe Abb. 30).

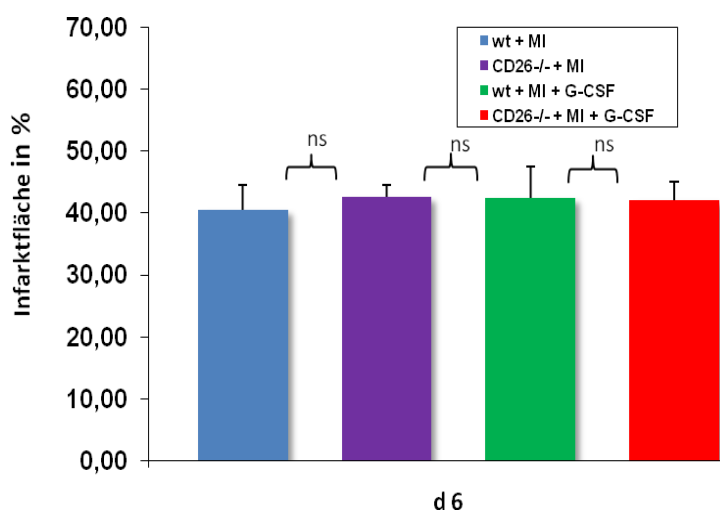


Abb.30 : Infarktgröße nach 6 Tagen (230)

30 Tage nach Myokardinfarkt konnte dagegen eine signifikante Reduktion der Infarktfläche (gemessen als Fibrosefläche der LV-Wand) in beiden G-CSF behandelten Gruppen verzeichnet werden. Wie in Abb.30 ersichtlich waren die Infarktflächen für die einzelnen Gruppen: wt + MI 33,6 ± 2,6%, CD26^{-/-} + MI 31,5 ± 1,7%, wt + MI + G-CSF 23,3 ± 3,7% und CD26^{-/-} + MI + G-CSF 22,4 ± 2,8%. Es

zeigte sich ein signifikanter Unterschied von 8,2 – 11,2 % der Infarktfläche zwischen den G-CSF behandelten und unbehandelten Tiergruppen. Ein Knock-out von DPPIV/CD26 führte in diesem Fall zu keinen signifikanten Veränderungen.

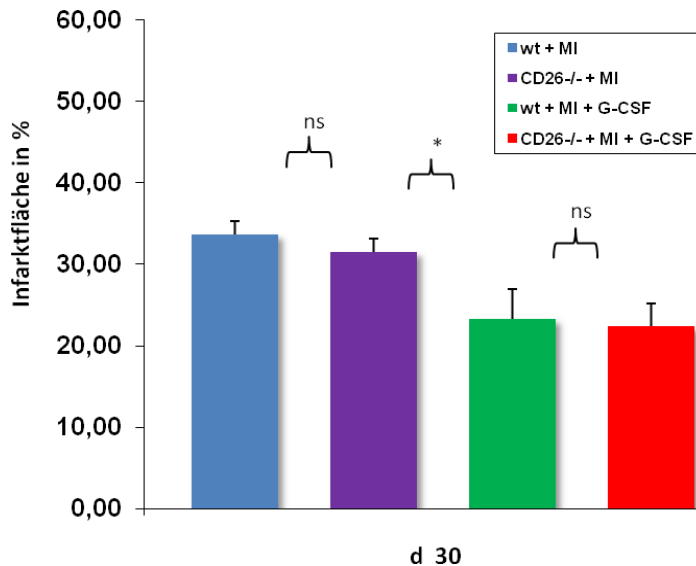


Abb.31 : Infarktgröße nach 30 Tagen (230)

3.2.2. Wanddicken der linksventrikulären Vorderwand

Obwohl sich die Infarktflächen der G-CSF behandelten Gruppen nicht signifikant voneinander unterschieden, zeigten sich dennoch deutliche Differenzen in der Wanddickenabnahme nach Myokardinfarkt. Abbildung 32. zeigt exemplarische Masson-Trichrom-Färbungen von Herzen der jeweiligen Behandlungsgruppen. Anhand dieser Schnitte konnten die Wanddicken des infarzierten linken Ventrikels 6 Tage sowie 30 Tage nach Myokardinfarkt untersucht werden.

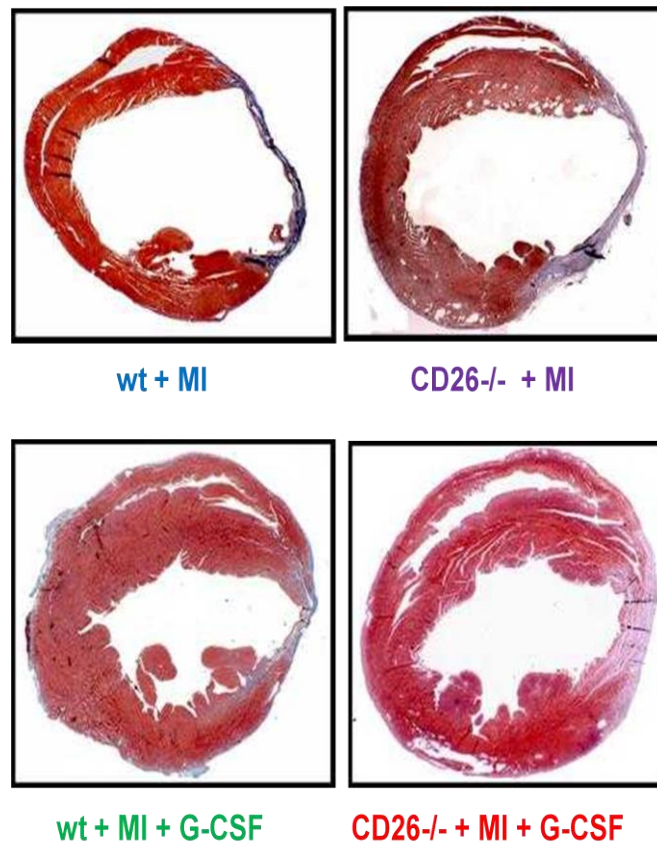


Abb.32 linksventrikuläre Wanddicken 30 Tage nach MI (230)

Nach 6 Tagen betrug die linksventrikuläre Wanddicke der unbehandelten Wildtyp-Gruppe $0,5\text{mm} \pm 0,05$, in der unbehandelten CD26^{-/-}-Gruppe $0,52\text{mm} \pm 0,05$, in der G-CSF behandelten Wildtyp-Gruppe $0,67\text{mm} \pm 0,09$ sowie in der G-CSF behandelten CD26^{-/-}-Gruppe $0,84\text{mm} \pm 0,08$. Statistisch gesehen ergab sich ein signifikanter Unterschied der Wanddicke in der G-CSF behandelten CD26^{-/-}-Gruppe verglichen mit allen unbehandelten Vergleichsgruppen. (siehe Abb.33)

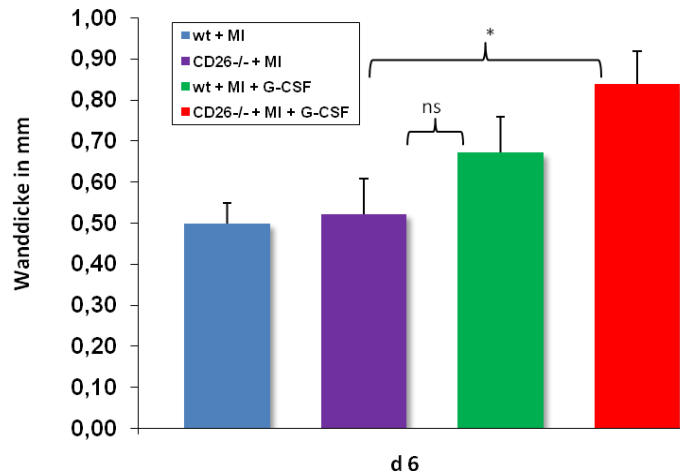


Abb.33: linksventrikuläre Wanddicke 6 Tage nach MI

30 Tage nach Infarkt zeigte sich in allen Gruppen die erwartete Abnahme der Wanddicke auf Grund des abgeschlossenen *Remodellingprozesses*. Analog zu Tag 6 zeigte sich bei G-CSF behandelten CD26^{-/-} Tieren (0,48mm ± 0,01) ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Wanddicke verglichen mit unbehandelten Wildtyp- (0,13mm ± 0,01), unbehandelten CD26^{-/-}-Mäusen (0,21mm ± 0,01) sowie G-CSF behandelten Wildtyp Tieren (0,28mm ± 0,03). (siehe Abb. 34)

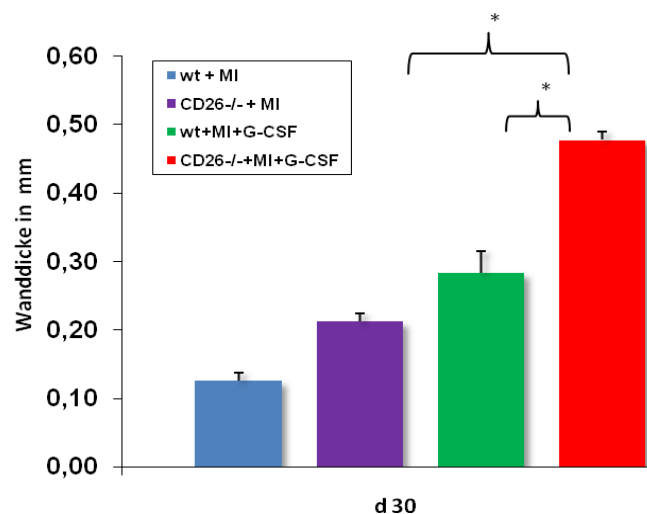


Abb.34 linksventrikuläre Wanddicke 30 Tage nach MI (230)

3.2.3 Neoangiogenese - CD31+ Kapillaren in der Infarkt-Grenzzone

Wie im Methodenteil bereits beschrieben, ist CD31 ein Adhäsionsmolekül, welches von allen Endothelzellen stark exprimiert wird und geeignet ist, Angiogenese zu beurteilen. Bei der Auswertung immunhistochemischer Schnitte 6 Tage nach Myokardinfarkt waren im Bereich der *Borderzone* (Grenzgebiet um den Infarkt) G-CSF behandelte CD26^{-/-} Tiere signifikant mehr CD31 positive Kapillaren detektierbar ($1923,79 \pm 76,2$ Zellen pro mm²) verglichen mit unbehandelten Wildtyp- ($926,58 \pm 66,06$ Zellen pro mm²) bzw. CD26^{-/-}-Mäusen ($1130,12 \pm 64,59$ Zellen pro mm²) sowie G-CSF behandelten Wildtyp Tieren ($1107,05 \pm 174,42$ Zellen pro mm²) (siehe Abb. 36). In Abbildung 35 sind exemplarisch immunhistochemische CD31 Färbungen aus der Randzone der unterschiedlichen Behandlungsgruppen dargestellt.

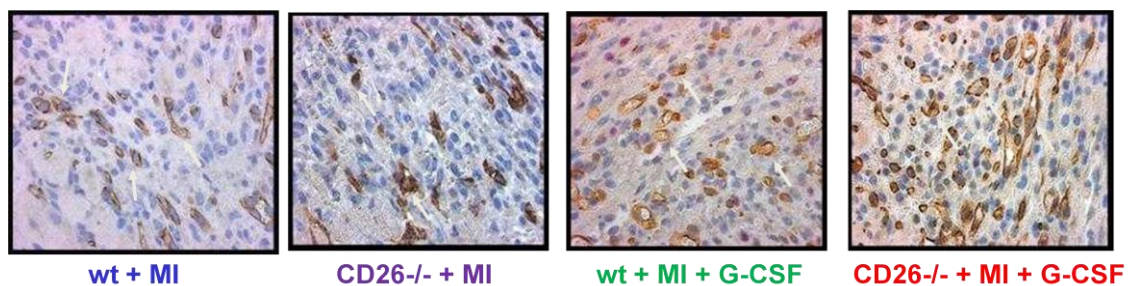


Abb. 35: Immunhistologische Anfärbung von CD31+ Kapillaren an Tag 6 (230)

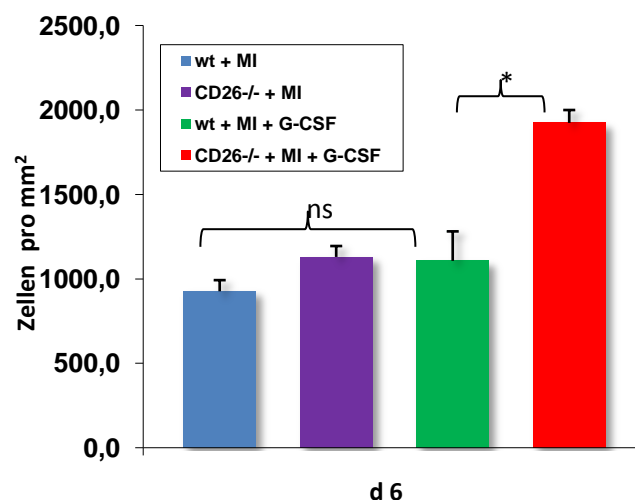


Abb. 36 : Anzahl der CD31+ Zellen in der Borderzone an Tag 6 (230)

3.3. Hämodynamik

3.3.1. Messungen der Herzfunktion

Nachdem sich hinsichtlich der Mortalität, der Infarktfläche sowie der Wanddicken signifikante Unterschiede in G-CSF behandelten CD26^{-/-} Mäusen abzeichneten, wurden die Auswirkungen auf die Herzfunktion der überlebenden Tiere 30 Tage nach Myokardinfarkt mittels Milar-Tip-Katheter-Messungen gemessen. Es wurden *in vivo* Herzfrequenz, endsystolischer Druck, Herzminutenvolumen, Auswurfraction (EF) und die arterielle Nachlast bestimmt. In Abbildung 37 sind repräsentativ Druck-Volumen-Kurven der verschiedenen Gruppen abgebildet.

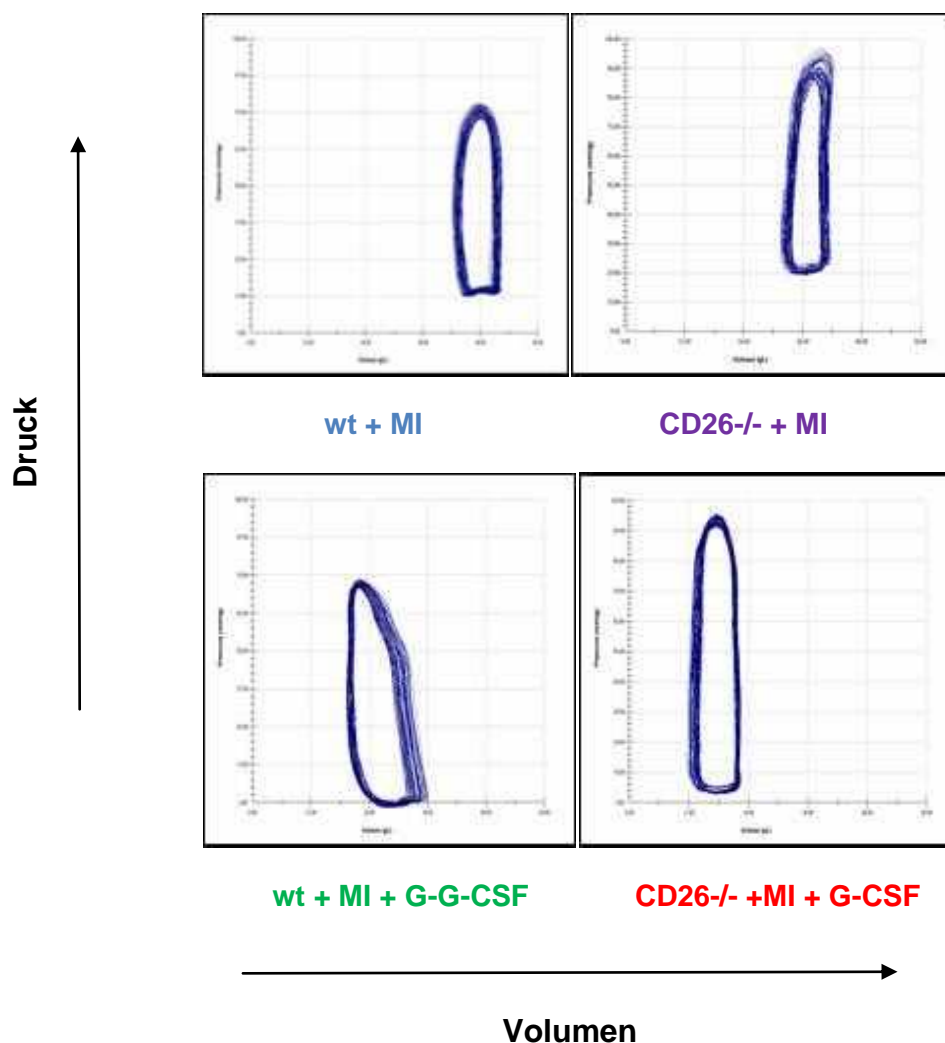


Abb.37 Druck-Volumen-Kurven der einzelnen Gruppen an Tag 30 (230)

3.3.2. Herzfrequenz

Die durchschnittliche Herzfrequenz der Wildtyp + MI ($431,04 \pm 38,82$), CD26^{-/-} + MI ($423,59 \pm 33,08$), Wildtyp + MI + G-CSF ($437,56 \pm 17,61$) sowie der CD26 + MI + G-CSF-Gruppe ($414,18 \pm 12,23$) ergab statistisch keinen signifikanten Unterschied. (siehe Abb.38)

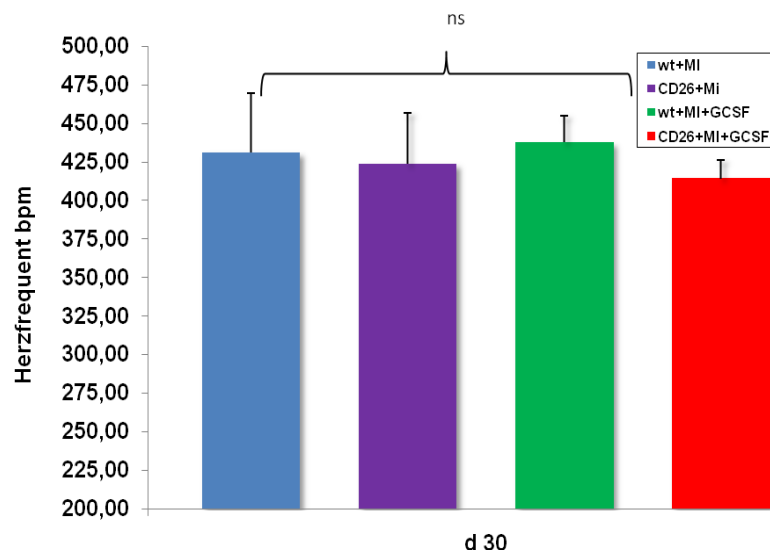


Abb.38: Herzfrequenz 30 Tage nach MI

3.3.3. Linksventrikulärer endsystolischer Druck

Hinsichtlich des endsystolischen Drucks des linken Ventrikels zeigte sich ein signifikanter Unterschied der G-CSF-behandelten CD26^{-/-} Gruppe ($83,63 \text{ mmHg} \pm 1,75$) zu beiden unbehandelten Vergleichsgruppen (Wildtyp + MI $69,17 \text{ mmHg} \pm 2,4$; CD26 + MI $73,14 \text{ mmHg} \pm 3,70$), jedoch nicht zu den G-CSF behandelten Wildtyp Tieren ($80,41 \text{ mmHg} \pm 2,18$). Diese wiederum zeigten sich bezüglich der Wildtyp-Vergleichsgruppe ebenfalls mit signifikant höheren Druckwerten, gegenüber der CD26 + MI Gruppe ergab sich ebenfalls ein Unterschied, das Signifikanz-Niveau wurde hierbei allerdings nicht erreicht. (siehe Abb. 39)

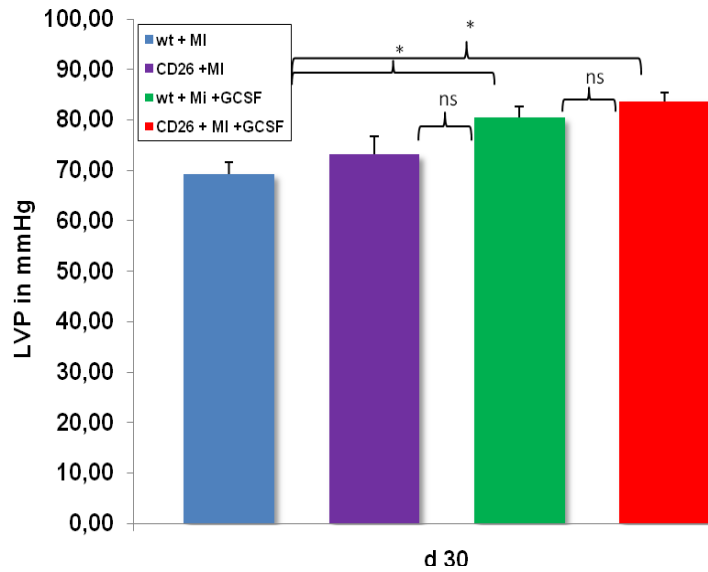


Abb. 39: Endsystolischer Druck des linken Ventrikels an Tag 30

3.3.4. Herzminutenvolumen

Das Herzminutenvolumen der G-CSF-behandelten CD26^{-/-} Tiere (4988,08 μ l/min \pm 201,04) war signifikant verbessert verglichen mit infarzierten wt-Tieren (3094,91 μ l/min \pm 706,38). Gegenüber den beiden anderen Gruppen CD26 + MI (3871,18 μ l/min \pm 439,14) und wt + MI + G-CSF (4230,17 μ l/min \pm 748,54) war die Pumpleistung deutlich ausgeprägter, statistisch gesehen allerdings nicht signifikant.(siehe Abb.40)

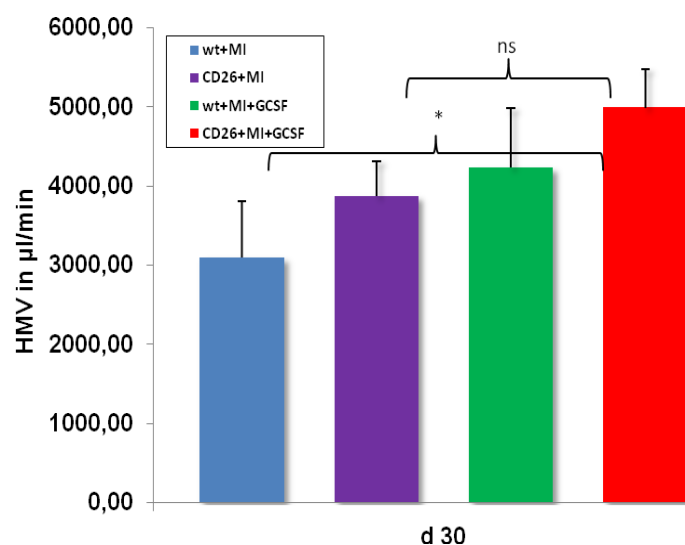


Abb. 40: Herzminutenvolumen an Tag 30

3.3.5. Ejektionsfraktion (EF)

Die Auswurfraction an Tag 30 nach Myokardinfarkt zeigte sich in der CD26 + MI + G-CSF-Gruppe ($42,13 \% \pm 1,54$) signifikant verbessert verglichen mit allen anderen Gruppen, insbesondere auch gegenüber den G-CSF behandelten Wildtyp Tieren ($30,21 \% \pm 3,34$). Letztere zeigten im Vergleich mit den unbehandelten Tieren (wt + MI $19,02 \% \pm 0,72$ und CD26 + MI $21,39 \% \pm 1,13$) ebenfalls eine signifikant verbesserte EF. (siehe Abb. 41)

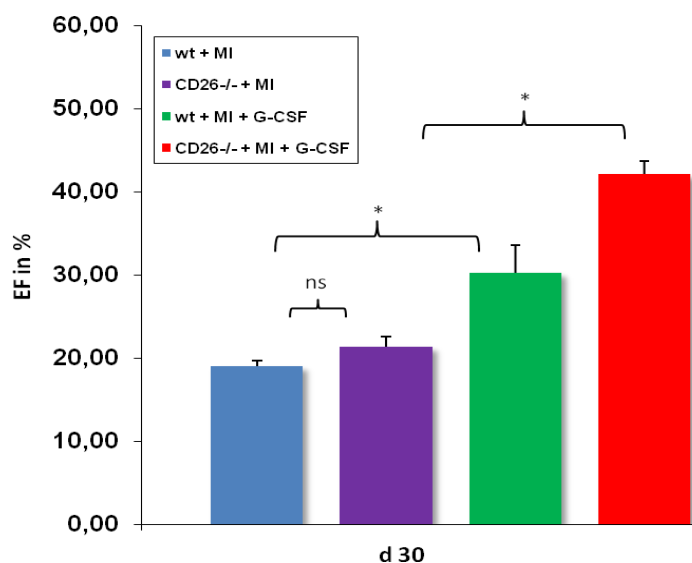


Abb.41 : Auswurfraction an Tag 30 (230)

3.3.6. Arterielle Nachlast

Die arterielle Nachlast gibt an, welcher Druck aufgebracht werden muss, um einen μl Blut auszuwerfen. Diese war bei unbehandelten Wildtyp-Mäusen ($10,95 \text{ mmHg} / \mu\text{l} \pm 2,05$) im Vergleich zu den anderen drei Gruppen deutlich erhöht, ein Signifikanzniveau konnte bei hohem Fehlerindikator jedoch nicht erreicht werden. Die restlichen Gruppen, CD26 + MI ($7,88 \text{ mmHg} / \mu\text{l} \pm 0,70$), wt + MI + G-CSF ($7,94 \text{ mmHg} / \mu\text{l} \pm 1,96$) sowie CD26 + MI + G-CSF ($7,32 \text{ mmHg} / \mu\text{l} \pm 0,63$) zeigten lediglich gering unterschiedliche Datensätze ohne Signifikanzen. (siehe Abb. 42)

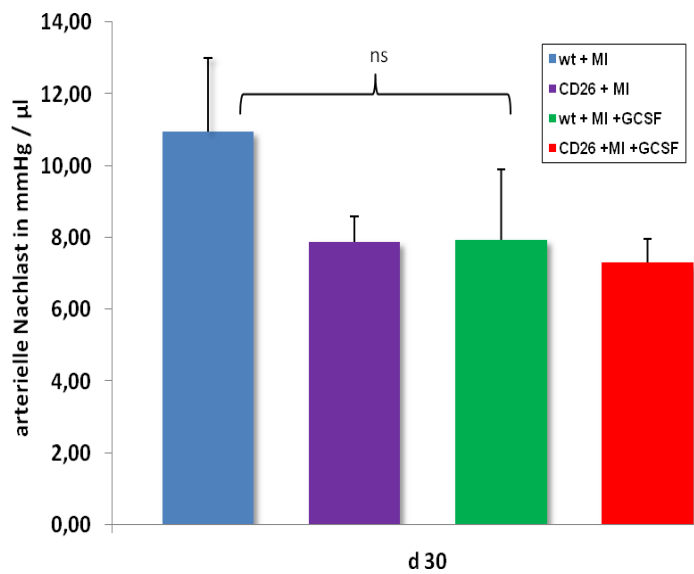


Abb. 42: Arterielle Nachlast an Tag 30

3.3.7. Enddiastolisches Volumen

Hinsichtlich des enddiastolischen Volumens im linken Ventrikel zeigte sich analog zur höheren Auswurfraction in der CD26 + MI + G-CSF Gruppe ($22,78 \mu\text{l} \pm 2,19$) ein signifikant geringeres Restvolumen bezogen auf alle Vergleichsgruppen. Die Gruppe der G-CSF behandelten Wildtyp-Mäuse ($32,35 \mu\text{l} \pm 2,74$) zeigte gegenüber den unbehandelten Tieren wt + MI ($41,03 \mu\text{l} \pm 4,95$) und CD26 + MI ($42,8 \mu\text{l} \pm 2,68$) ebenfalls ein signifikant niedrigeres Volumen. Zwischen den letztgenannten Versuchsgruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied. (siehe Abb. 43)

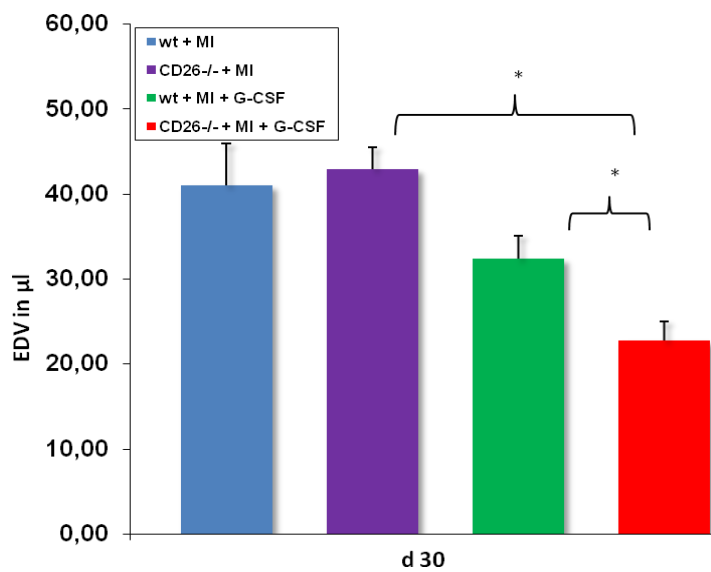


Abb.43: Enddiastolisches Volumen an Tag 30 (230)

3.4. Stammzellmobilisation und –Homing

3.4.1. Stammzellmobilisation

Die Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut wurde mittels Durchflusszytometer am 6. Tag nach Myokardinfarkt untersucht. Es wurde die Ko-Expression des Panleukozytenmarkers CD45, mit bekannten Stammzellmarkern wie CD34, c-kit und Sca-1 analysiert. Ebenfalls wurde die Ko-Expression des wichtigen Homingfaktor-Rezeptors CXCR4 untersucht. FACS Analysen zur Ko-Expression von CD45⁺/CD34⁺ ergaben für G-CSF behandelte Wildtyp (1,83 % ± 0,20) bzw. CD26^{-/-} Tiere (1,63% ± 0,24) signifikant höhere Werte von CD45⁺/CD34⁺ Blutstammzellen verglichen mit unbehandelten Tieren (wt + MI 0,45% ± 0,05; CD26 + MI 0,49% ± 0,02). (siehe Abb. 44)

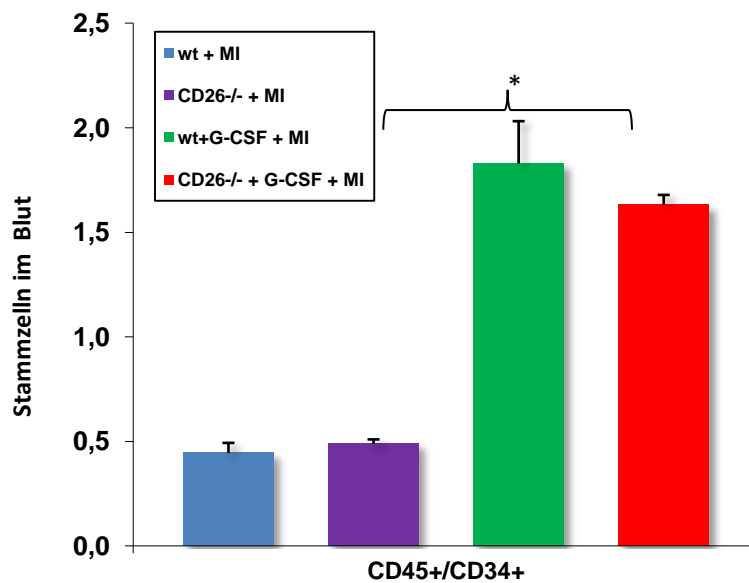


Abb.44: CD45⁺/CD34⁺ Zellen im peripheren Blut

Bei der Sub-Analyse CD45⁺/CD34⁺/CXCR4⁺ Blutzellen zeigte sich ein ähnliches Bild. Die Anzahl an CD45⁺/CD34⁺/CXCR4⁺ Zellen waren in beiden unbehandelten Versuchsgruppen (wt + MI 0,023% ± 0,01 ; CD26 + MI 0,025% ± 0,01) signifikant niedriger verglichen mit G-CSF behandelten Tieren (wt + MI + G-CSF 0,36% ± 0,18; CD26-/- MI + G-CSF 0,36% ± 0,11). (siehe Abb. 45)

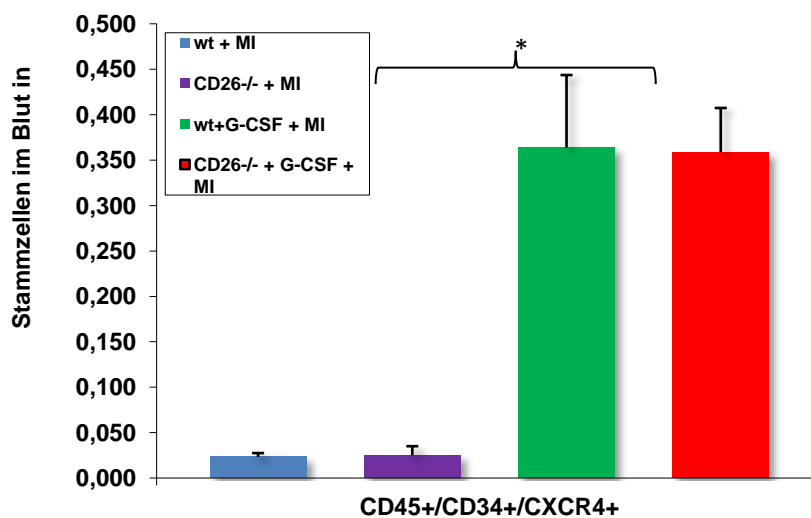


Abb.45: CD45⁺/CD34⁺/CXCR4⁺ Zellen im peripheren Blut

Wie in Abbildung 46 ersichtlich, war die Anzahl an $CD45^+/c-kit^+$ ($0,99\% \pm 0,21$), $CD45^+/CD31^+$ ($38,43\% \pm 5,53$) und $CD45^+/Sca-1^+$ ($33,49\% \pm 5,39$) Blutzellen bei G-CSF behandelten $CD26^{-/-}$ Tieren ebenfalls signifikant deutlich höher gegenüber den drei Vergleichsgruppen.

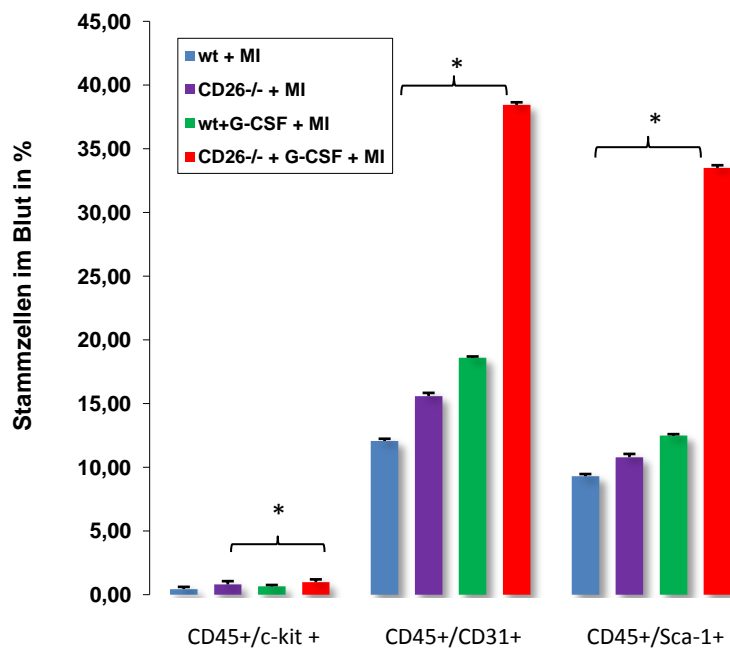


Abb. 46: $CD45^+/c-kit^+$, $CD45^+/CD31^+$, $CD45^+/Sca-1^+$ Zellen im peripheren Blut

3.4.2 Expression von Stammzellmarkern auf $CD26^+$ Zellen aus dem Knochenmark und peripheren Blut

Die Durchflusszytometrische Analyse mononuklearer $CD45^+$ Zellen bei Wildtyp Tieren zeigte eine $CD26$ Expression von durchschnittlich $30\% \pm 3,66$ im Knochenmark und $12\% \pm 3,05$ im peripheren Blut. Wie zu erwarten war die $CD26$ Expression bei $CD26^{-/-}$ Tieren sowohl im Blut als auch im Knochenmark kaum messbar. (siehe Abb. 47)

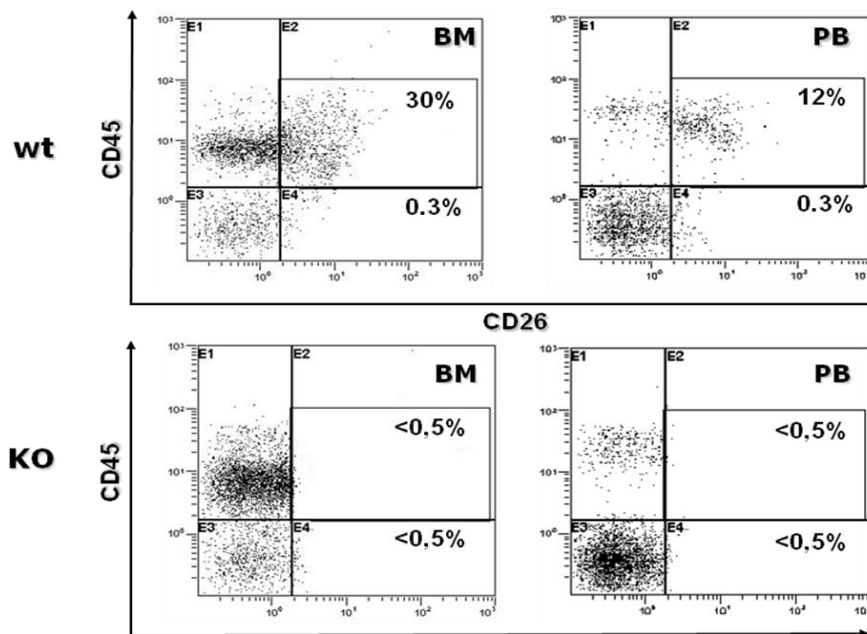


Abb.: 47 Expression von $CD45^+$ und $CD\ 26^+$ Zellen im Knochenmark (BM) und peripheren Blut (PB) (230)

Eine erweiterte Sub-Analyse der $CD45^+/CD26^+$ Zellen bei Wildtyp-Mäusen ergab sowohl im Knochenmark als auch im peripheren Blut eine hohe Ko-Expression von CD31 (KM: 90,7 %; Blut: 89,6%), sowie von Sca-1 (KM: 29,3 %; Blut: 64,6%). Andere Stammzellmarker wie CD34 (KM: 21,1 %; Blut: 4,2 %) und c-kit (KM: 23,9 %; Blut: 3,8 %) sowie der „Homing-Rezeptor“ CXCR4 (KM: 8,2 %; Blut: 2,7 %) waren ebenfalls exprimiert, zeigten jedoch geringere Werte. (siehe Abb. 48)

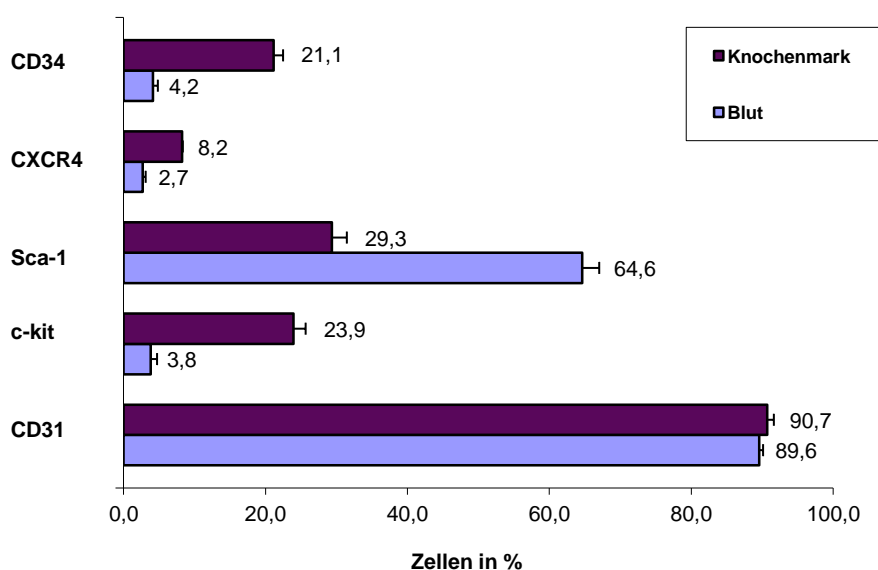


Abb. 48: Expression von Stammzellmarkern auf $CD45^+/CD26^+$ Zellen im Knochenmark und peripheren Blut bei Wildtyp-Mäusen (230)

Des Weiteren wurde wie in Abbildung 49 ersichtlich die Ko-Expression von CD26 auf den vorgenannten Stammzellpopulationen untersucht. Im peripheren Blut zeigte sich eine relative hohe Co-Expression von CD26 auf CD34⁺, CXCR4⁺, Sca-1⁺, c-kit⁺ sowie CD31⁺ Blutzellen mit Werten zwischen 56% - 68%. Auch im Knochenmark waren durchschnittlich etwa 50 % der Zellen auch Träger von CD26, lediglich bei c-kit⁺ Zellen ergaben sich mit 27,7 % geringere Messdaten.

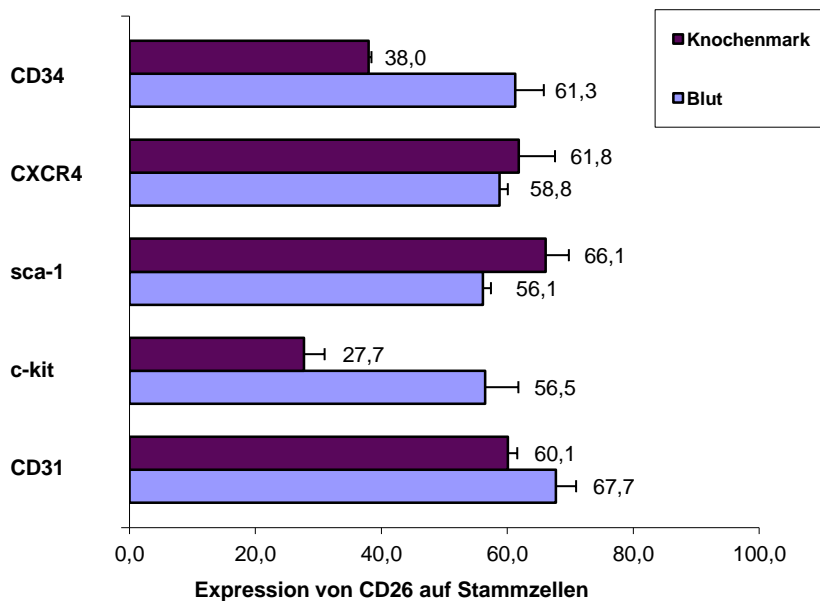


Abb. 49: CD26 Expression auf verschiedenen Stammzellpopulationen bei Wildtyp-Mäusen (230)

3.4.3. Stammzellhoming in das Herz

Untersucht wurde hier mittels Durchflusszytometrie die Anreicherung verschiedener Stammzellpopulationen im Myokard zwei Tage nach Infarkt. Unterschieden wurden eingewanderte Blutstammzellen und endogene Stammzellen im Herzen selbst. Um Blutstammzellen zu detektieren wurden die kardialen Zellpopulationen zusätzlich mit dem Panleukozytenmarker CD45 gefärbt, der auf nahezu allen zirkulierenden mononuklearen Blutzellen exprimiert wird. Endogene kardiale Stammzellpopulationen exprimieren kein CD45 und kein CD34, so dass der Ausschluss dieser Blutzell-Marker zur Identifikation endogener Zellpopulationen herangezogen werden konnte.

3.4.3.1. Blutstammzellen

In Hinblick darauf, dass aktives SDF-1 die Migration Gefäßwachstum fördernder CD34 Progenitorzellen triggert (198) untersuchten wir die Anzahl CD34⁺ Zellen im Herzen 2 Tage nach Infarkt. Um die aus dem peripheren Blut eingewanderten Zellen zu detektieren, wurde der hämatopoetische Marker CD45 zusätzlich verwendet. In der Gruppe der infarzierten, G-CSF behandelten CD26^{-/-} Tiere zeigte sich ein deutlich signifikanter Anstieg des Anteils CD45⁺/CD34⁺ Progenitorzellen (1,65 % ± 0,17) gegenüber allen anderen Gruppen (wt + MI: 0,41 % ± 0,05; CD26 + MI: 0,81 % ± 0,08; wt + MI + G-CSF: 0,94 % ± 0,14%). In Abbildung 50. sind diese Ergebnisse nochmals beispielhaft im Auswertungsraster dargestellt.

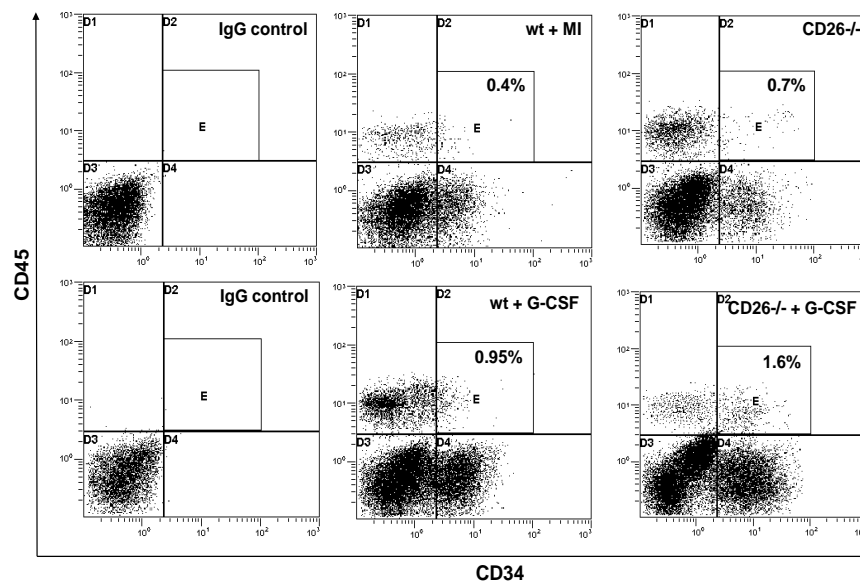


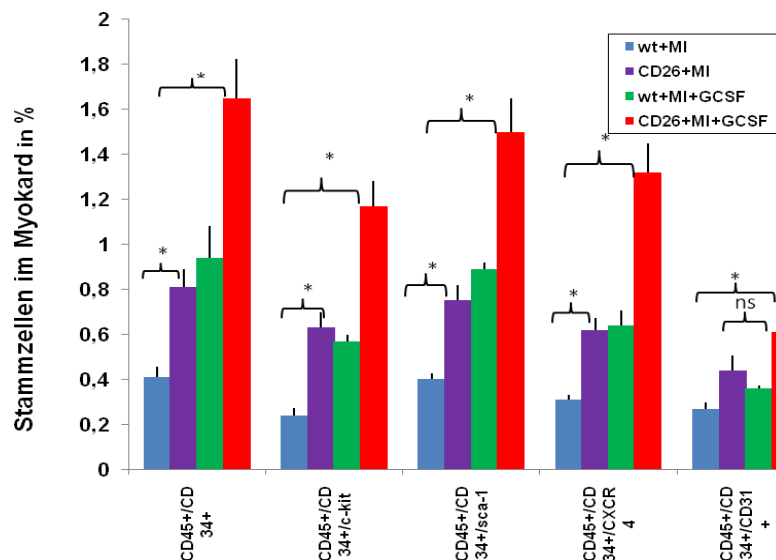
Abb. 50 : Einwanderung CD45⁺/CD34⁺ Blutstammzellen in das Myokard (230)

Auch innerhalb der jeweiligen Untergruppen von CD45⁺/CD34⁺/c-kit⁺, CD45⁺/CD34⁺/Sca-1⁺, CD45⁺/CD34⁺/CXCR4⁺ und CD45⁺/CD34⁺/CD31⁺ Blutzellen ergaben sich signifikant höherer Werte in der CD26 + MI + G-CSF Gruppe gegenüber den drei Vergleichsgruppen. Weiterhin ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den annähernd gleichen Gruppen wt + MI + G-CSF bzw.

CD26 + MI verglichen zur unbehandelten wt + MI Gruppe. Die genauen Daten sind den Abbildungen 51. und 52. zu entnehmen.

	CD45+/CD3 4+	CD45+/CD3 4+/c-kit	CD45+/CD3 4+/sca-1	CD45+/CD34+/ CXCR4	CD45+/CD34+/ CD31+
wt+MI	0,41± 0,05	0,24± 0,03	0,4± 0,03	0,31± 0,02	0,27± 0,03
CD26+MI	0,81± 0,08	0,63± 0,07	0,75± 0,07	0,62± 0,05	0,44± 0,06
wt+MI+G- CSF	0,94± 0,14	0,57± 0,03	0,89± 0,03	0,64± 0,07	0,36± 0,01
CD26+MI+ G-CSF	1,65± 0,17	1,17± 0,11	1,5± 0,15	1,32± 0,13	0,61± 0,12

Abb. 51 (oben) und 52 (unten): Einwanderung (Homing) von Blutstammzellen in das infarzierte Myokard



Dabei war auf über 80 % der CD 45⁺/CD34⁺ Zellen im Myokard der mit G-CSF behandelten CD26^{-/-} Tiere der „Homing-Rezeptor“ CXCR4 nachweisbar, ebenso zeigte sich eine sehr hohe Anreicherung des Stammzellmarkers Sca-1 (92,2%) (siehe Abb. 53.)

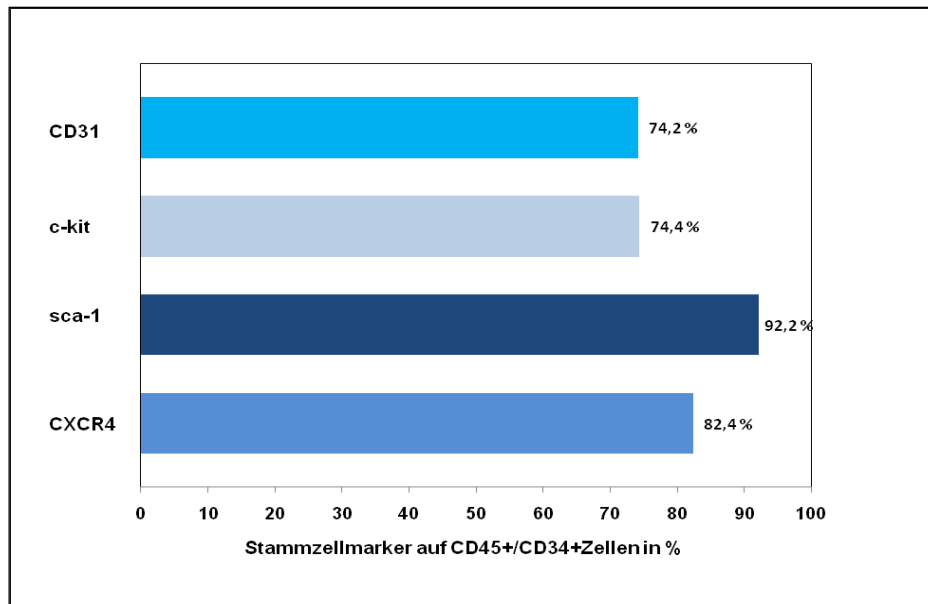


Abb. 53: Subpopulationen von in das Myokard eingewanderten Stammzellen/-markern in der Gruppe CD26^{-/-} + MI + G-CSF

3.4.3.2. Endogene kardiale Stammzellen

Zur Quantifizierung endogener kardialer Stammzellen, die nicht aus dem Blut einwandern, sondern direkt im infarzierten Herzgewebe ansässig sind, wurde der Anteil CD45⁺/CD34⁺/c-kit⁺ und CD45⁺/CD34⁺/Sca-1⁺Zellen bestimmt.

Hinsichtlich der Population endogener CD45⁺/CD34⁺/c-kit⁺ kardialer Stammzellen zeigten sich signifikant höherer Werte bei G-CSF behandelten CD26^{-/-} Tieren(0,27 % ± 0,04) gegenüber allen Vergleichsgruppen (wt + MI 0,08 % ± 0,02; CD26 + MI 0,14 % ± 0,02, wt + MI + G-CSF 0,07% ± 0,02) (siehe Abb. 54).

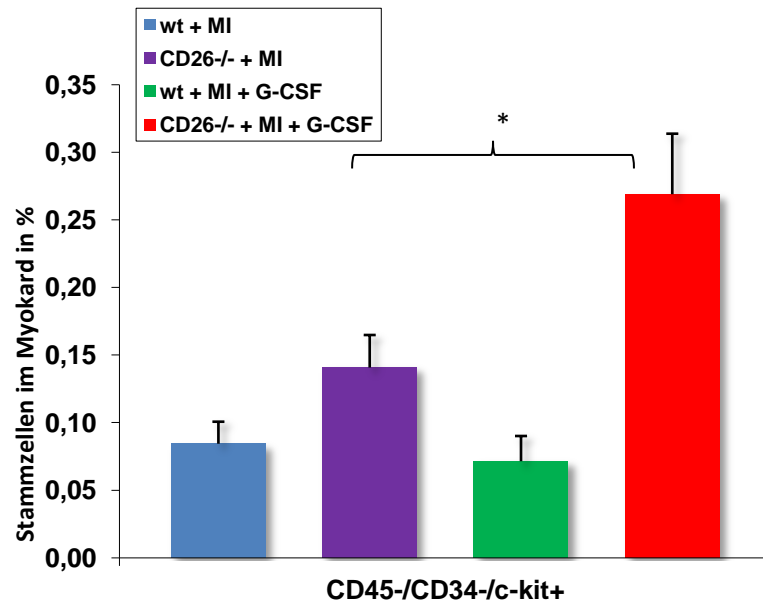


Abb. 54: Endogene $c\text{-kit}^+$ Stammzellen im Herzen nach MI

Kein signifikanter Unterschied ergab sich zwischen den vier Versuchsgruppen bezüglich endogener $\text{CD45}^+/\text{CD34}^+/\text{sca-1}^+$ Zellen, wobei sich auch hier ein Trend zu höheren Werten bei $\text{CD26}^{-/-}$ Tieren ergab (wt + MI $14,01\% \pm 1,15$; $\text{CD26}^{-/-}$ + MI $11,88\% \pm 3,49$; wt + MI + G-CSF $16,46\% \pm 1,55$; $\text{CD26}^{-/-}$ + MI + G-CSF $23,32\% \pm 2,82$). (siehe Abb. 55)

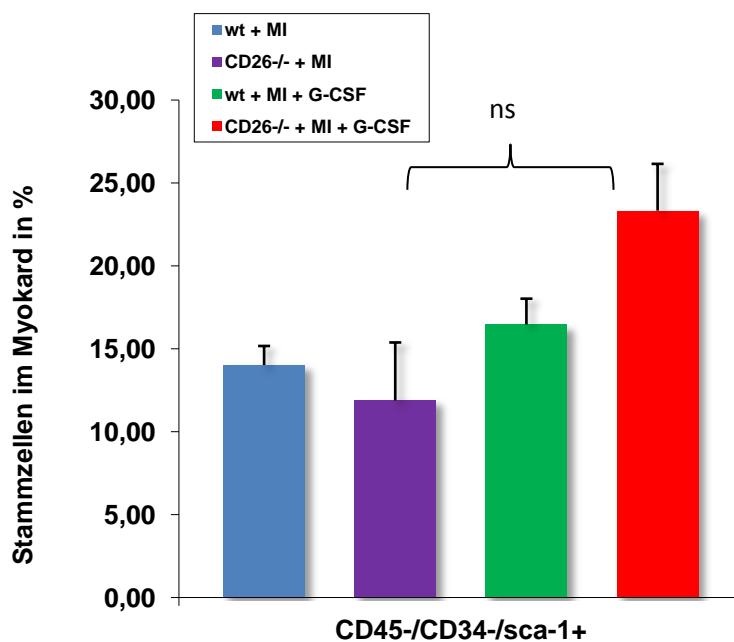


Abb. 55: Endogene sca-1^+ Stammzellen im Herzen nach MI

4. DISKUSSION

Bei den durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der Auswirkung von CD26-Inhibition auf das Homing und die Mobilisation von Stammzellen nach G-CSF Behandlung bei stattgehabtem Myokardinfarkt konnte gezeigt werden:

- Die Gabe von G-CSF bei CD 26 ^{-/-} Tieren führt zu einer signifikant besseren Überlebensrate (> 20 %) nach 30 Tagen im Vergleich zu den Kontrollgruppen.
- 30 Tage nach LAD-Ligation kann bei den G-CSF-behandelten CD 26 ^{-/-} Tieren ein deutlich besseres kardiales „*Outcome*“ verzeichnet werden. Die verbesserte kardiale Pumpfunktion korreliert hierbei mit einer geringeren Infarktgröße und einer verminderten Abnahme der linksventrikulären Vorderwanddicke gegenüber den Vergleichsgruppen.
- Inhibition der Dipeptidyl-Peptidase IV führt in Kombination mit G-CSF-Stimulation zu einer vermehrten Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut.
- Unter Hemmung von CD26 und G-CSF-Gabe kommt es zu einem gesteigerten Homing von CD34⁺/CXCR4⁺ Progenitorzellen in das Herz mit Folge einer verbesserten Neoangiogenese und Zellproliferation.

4.1. G-CSF-Behandlung unter CD 26 Inhibition senkt die Mortalität und verbessert die Pumpfunktion

Dass die Gabe von stammzellmobilisierenden Zytokinen wie G-CSF eine wirksame Therapie nach akutem Myokardinfarkt darstellt, wurde im Jahr 2001 erstmals von der Gruppe um Anversa/Orlic gezeigt (211). Die behandelten Tiere hatten dort eine um 68% niedrigere Mortalität als die Kontrolltiere. Dies war assoziiert mit einer geringeren Infarktgröße (-40%) und einer signifikant höheren Auswurfraction. Bezüglich der Mortalität kamen Deindl et al. zu ähnlichen Ergebnissen. Nach 5-tägiger G-CSF-Behandlung überlebten 30 Tage post MI 68,8% aller Tiere gegenüber 46,6% überlebender Tiere in der Kontrollgruppe (212). Es zeigte sich des Weiteren eine gesteigerte Neoangiogenese/ Arteriogenese. Analog hierzu auch unsere Ergebnisse: wir konnten zeigen, dass in beiden G-CSF- behandelten Gruppen das Überleben nach 30 Tagen signifikant besser war. 20 % mehr CD 26^{-/-} Tiere überlebten nach G-CSF-Gabe gegenüber den Vergleichsgruppen. Assoziiert war die geringere Mortalität mit einer besseren Pumpfunktion. Die gemessene Herzfrequenz in den einzelnen Gruppen zeigte hierbei kaum Unterschiede, was den Einfluss eines Kraft-Frequenz-Effektes ausschließt. Die Neoangiogenese war ebenfalls gesteigert, was ursächlich für eine geringere Infarktfläche durch Versorgung über Kollateralen sein könnte. Harada postulierte 2005 die kardioprotektive/-regenerative Wirkung von G-CSF beruhe primär auf Hemmung der Apoptose, nicht auf Mobilisierung von Stammzellen. Nach Bindung von G-CSF an seinen Rezeptor komme es zur Aktivierung der **Janus family Tyrosin Kinase (JAK)** sowie des **Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)** (213,214) welche wiederum einen antiapoptotischen Effekt über Inhibition von Bcl-2 und Bcl-xL ausüben (74). Obwohl in unseren Versuchsreihen nur in der Kombination von G-CSF-Stimulation und DPPIV Hemmung eine deutliche Reduktion der bindegewebigen Vernarbung des Infarktgebietes verzeichnet werden konnte, hat auch SDF-1 α allein nachgewiesenermaßen über Phosphorylierung von ERK und AKT eine antiapoptotische Wirkung (215). Die verminderte Apoptose kann erklärend für die deutlich dickere Wandschicht des linken Ventrikels nach MI und G-CSF Behandlung sein. Durch verlangsamte/verminderte Wanddickenabnahme in G-CSF behandelten CD26^{-/-} Tieren kommt es, nach dem Gesetz von Laplace (Wandspannung \approx Ventrikeldruck \times Ventrikleradius / Wanddicke), zu einer Reduktion der

Wandspannung, was ggf. der Dilatation des infarzierten Herzens entgegenwirkt. Dies wiederum bedeutet ein vermindertes Risiko für eine Herzruptur, die häufigste Todesursache bei C57BL/6-Mäusen nach Infarkt (216).

4.2. G-CSF Gabe mobilisiert Stammzellen im Wildtyp und CD26^{-/-} Tier

Die positive Wirkung von G-CSF auf die Mobilisation von Stammzellen ist bereits seit längerem bekannt. Im klinischen Alltag wird es seit längerem bereits bei immunsupprimierten Patienten nach Knochmarktransplantation verwendet (217,218). Die genauen Wirkmechanismen sind sehr komplex und die Forschung fördert immer wieder neue Aspekte zu Tage. Gesichert ist die Mitwirkung von Proteasen wie MMP9 und Cathepsin G im Knochenmark, die zu einer Spaltung der SDF-CXCR4-, c-kit-SCF sowie der VLA4-VCAM-Achse führen und somit Stammzellen freisetzen (80-85). Eine Steigerung der Mobilisation von CD45⁺/CD34⁺ und CD45⁺/CD34⁻ Zellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut von infarzierten Wildtyp-Mäusen nach G-CSF Behandlung konnte in unserer Arbeitsgruppe 2006 nachgewiesen werden (128). Auch SDF-1 in seiner aktiven Form wurde von Aiuti et al. bereits 1997 eine Rolle bei der Mobilisation von CD34⁺ Progenitorzellen zugeschrieben (191). Ein kleiner, jedoch signifikanter Prozentsatz dieser Zellpopulation exprimiert ebenfalls CD26 auf seiner Oberfläche, über negative Rückkopplung kommt es so wohl zur Autoregulation (200). Zur Stammzellmobilisation mittels G-CSF postulierte die Gruppe um Christopherson, CD26 sei essentiell für die G-CSF induzierte Mobilisation von Progenitorzellen aus dem Knochenmark (207,208). Diese Aussage, ebenfalls auf Grundlage von Forschung am CD26^{-/-} Mausmodell gestellt, zeigt eine Diskrepanz zu unseren Ergebnissen. Unsere Daten zeigen nach G-CSF Behandlung sowohl in der Wildtyp- als auch in der CD26^{-/-}-Gruppe eine signifikant gesteigerte Mobilisationsrate von CD45⁺/CD34⁺ und CD45⁺/CD34⁺/CXCR4⁺ Zellen. Des Weiteren konnten signifikant mehr CD45⁺/c-kit⁺, CD45⁺/CD31⁺ und CD45⁺/Sca-1⁺ Populationen bei den behandelten CD26^{-/-} Tieren gegenüber allen Vergleichsgruppen detektiert werden. Im Gegensatz zu der These von Christopherson et al., dass es nach G-CSF-Gabe zu einer gehemmten Mobilisation von Progenitorzellen in CD26^{-/-} Tieren in das periphere Blut kommt, zeigen unsere Daten sogar eine Verbesserung. Mögliche

Gründe für die Diskrepanz finden sich im unterschiedlichen Versuchsaufbau. Zum einen erfolgte die Gabe von G-CSF bei Christopherson nur über 2, bzw 4 Tage hinweg mit 2x täglicher Gabe von 2,5 µg G-CSF , während in unserem Modell eine Behandlung über 6 Tage mit 100 µg/kg KG /d durchgeführt wurde. Sowohl das Zeitintervall, als auch die Dosis ist in unserer Studie größer gewählt. Zum anderen erfolgte die Bestimmung der Mobilisationsrate bei uns über Durchflusszytometrie des jeweiligen Mediums mit Stammzelloberflächenmarkern, wohingegen die andere Forschungsgruppe das Medium zunächst für 7 Tage mit FBS, EPO und SCF bebrütete und anschließend „*Colony forming units*“ analysierte. Ein alternativer Erklärungsansatz wäre auch, dass die Mobilisation der Stammzellen über aktives SDF-1 in größerem Ausmaß getriggert wird, als bisher angenommen. Diesem Ansatz entsprechen die aktuellen Ergebnisse einer Studie von Fadini et al, die nach Gabe von Sitagliptin (DPPIV Inhibitor, siehe 1.3.8.) bei Patienten mit Diabetes Typ 2 sowohl einen Anstieg von SDF-1 als auch eine vermehrte Mobilisation von endothelialen Progenitorzellen feststellen konnten (229). Eine Weiterführung der von Aiuti et al begonnenen Untersuchungen der SDF-1 Kaskade wird diesbezüglich weitere Erkenntnisse liefern.

4.3. G-CSF Gabe unter CD 26 Hemmung führt zu einem vermehrten Homing von CD34+/CXCR4+ Progenitorzellen in das Herz

Wie unter 1.4.1 bereits beschrieben, nimmt SDF-1 eine wesentliche Rolle beim Homing von Progenitorzellen ein, insbesondere in Hinblick auf CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen, die den korrespondierenden Homingfaktor-Rezeptor CXCR4 exprimieren (195). Nach SDF-1 Aktivierung kommt es über die Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration unter Mitbeteiligung von Integrinen und Selektinen zur gradientengerichteten Wanderung der CD34+/CXCR4+ Zellen, welche dann nach Erreichen des Zielortes durch Bindung von SDF-1 mit seinem Rezeptor CXCR4 fixiert werden (196). In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass SDF-1 in seiner aktiven Form über Bindung an seinen Rezeptor CXCR4 zu einem verbesserten Homing von Stammzellen in das Knochenmark führt (190, 200,201).

Im Herzen konnte nach Ischämie eine „Hochregulation“ von SDF-1 über HIF1- α nachgewiesen werden, welche allerdings nur für 48 Stunden anhält (192, 219, 220). Die Inaktivierung des wichtigen Homingfaktors wird durch CD26 mittels Peptidabspaltung bewirkt. Durch Verwendung des CD26 „Knock-Out“ Modells wurde dies in der vorliegenden Versuchsreihe unterbunden und somit SDF-1 in seiner aktiven Form erhalten (siehe Abb.56).

Unserer Hypothese nach sollte durch gezielte Ausschaltung der SDF-1-inaktivierenden Ektopeptidase CD26 das Stammzellhoming in das ischämische Myokardgewebe verbessert werden.

Entsprechend dieser Vermutung konnten in der vorliegenden Arbeit deutlich mehr CD45⁺/CD34⁺ Zellen im infarzierten Myokard nachgewiesen werden, insbesondere in Kombination mit G-CSF- Gabe. CD34⁺ Progenitorzellen, welche c-kit, sca-1 und CD31 ko-exprimierten zeigten ebenfalls eine Steigerung des myokardialen Zell-Homings. Analog hierzu die Ergebnisse von Askari et al. und von Segers et al., die (wenngleich in einem invasiven Versuchsmodell) nach Transplantation von SDF-1 exprimierenden Fibroblasten, bzw. CD26/MMP2 (Proteolyse resistentes SDF-1) ein gesteigertes *Homing* von Stammzellen beobachten konnten (198, 202).

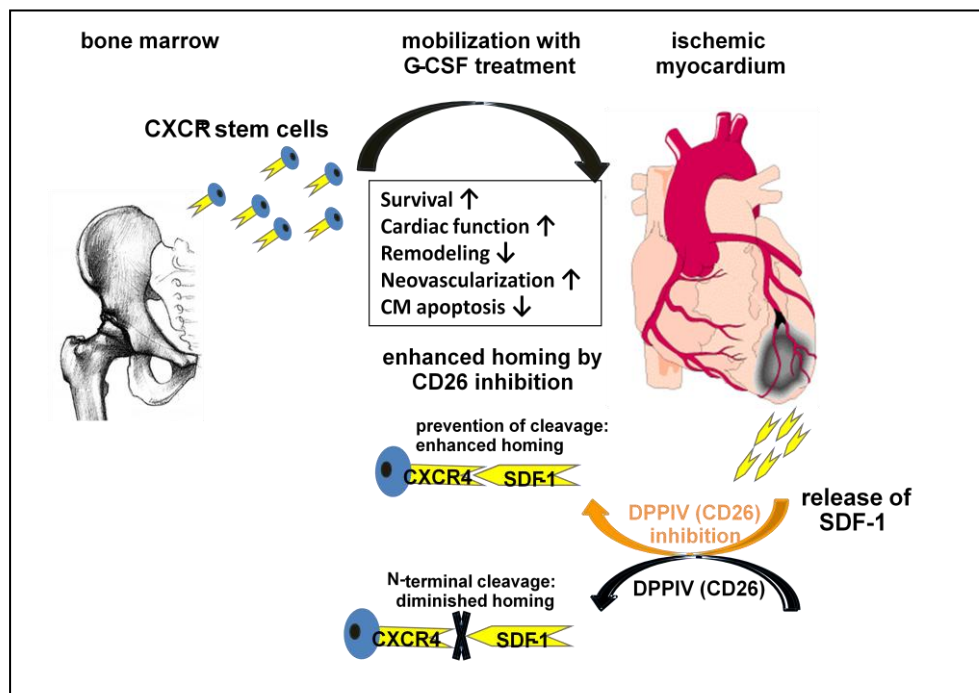


Abb.56 Mechanismus und Auswirkungen des gesteigerten Homings von CXCR⁺ Progenitorzellen durch Hemmung der CD26-Aktivität am ischämischen Herzen.(232)

Die positiven Effekte von G-SCF auf das infarzierte Herz wurden bereits unter 4.1 erörtert. Die Wirkung von SDF-1 in seiner aktiven Form beruht vermutlich auf zwei verschiedenen Mechanismen.

Wie in Abb. 56 aufgezeigt, werden zum einen von den vermehrt rekrutierten CD34+/CXCR4+ und c-kit/CXCR4+ Progenitorzellen proangiogenetische und antiapoptotische Wachstumsfaktoren exprimiert. Hierzu gehören der Insulin-like-growth-factor, der vascular-endothelial-growth-factor und der hepatocyte-growth-factor, welche Neoangiogenese und eine reduzierte Apoptose von Kardiomyozyten bewirken (231,232). Die eingewanderten c-kit+ Zellen könnten weiterhin über parakrine Mechanismen endogene kardiale Stammzellen stimulieren und somit indirekt an einer myokardialen Regeneration beteiligt sein, wie kürzlich in der Arbeit von Loffredo et al beschrieben (233). Bezüglich der Quelle von potentiellen kardialen Progenitorzellen konnte Smart et al. 2007 zeigen, dass das Peptid Thymosin β 4 (T β 4) epikardiale Progenitorzellen stimuliert und somit die Neoangiogenese fördert (235). In der neuesten Studie dieser Forschungsgruppe konnte mittels genetischer Zellmarkierung 7 Tage nach Myokardinfarkt gezeigt werden, dass Wilms-Tumor-1 (Wt1+) positive Progenitorzellen im Herzen in der Lage sind, sich zu Kardiomyozyten zu differenzieren. Mittels MRT wurden 28 Tage nach Infarkt signifikant bessere kardiale Funktionsparameter (insb. EF, enddiast./systol. Volumen) sowie ein besseres *Outcome* verzeichnet (236).

Zum anderen könnten intrinsische Effekte eine Rolle spielen, welche direkt über eine Stimulation von CXCR4-Rezeptoren durch SDF-1 die Proteinkinase B (PKB/Akt) in Endothelzellen und Kardiomyozyten aktivieren und somit die Neoangiogenese fördern und die Apoptose verhindern (232,234).

Grundsätzlich bleibt vor diesem Hintergrund unklar, welche Rolle die SDF-1/ CXCR4-Achse bei direkten und indirekten Reparaturprozessen nach Myokardischämie spielt. Weiterhin ist unklar, ob SDF-1/ CXCR4-Interaktionen endogene kardiale Stammzellen stimulieren und somit zu einer Verbesserung der kardialen Regeneration führen.

4.4. Limitationen der Arbeit

Die Testreihen dieser Arbeit wurden allesamt am Tiermodell durchgeführt. Das angewandte Mausmodell, die Induktion eines Myokardinfarkts mittels LAD-Ligation, ist in der kardiologischen Forschung bereits seit längerem etabliert (223). Die pathophysiologischen Abläufe bei Tier und Mensch sind nahezu identisch, wenn auch im Gegensatz zum Menschen die KHK / Atherosklerose beim Tier eher selten (gerade im Hinblick auf die Risikofaktoren Diabetes, Adipositas, Nikotin) ist und eine infektiöse Genese ursächlich im Vordergrund steht. Beim Menschen ist im Akutstadium die schnelle Wiedereröffnung des verschlossenen Herzkranzgefäßes mittels PTCA (224) oder Lyse-Therapie (225) Goldstandard, dies lässt sich im Mausmodell nur schwer verwirklichen. Ebenso kann anhand dieses Mausmodells nicht geklärt werden, ob die Gabe von Medikamenten wie Thrombozytenaggregationshemmern, die beim Menschen nach akutem Myokardinfarkt standardmäßig eingesetzt werden, die Versuchsergebnisse beeinflussen würde (226,227).

Die Tiere wurden des Weiteren nicht nur einem Myokardinfarkt, sondern auch noch vorausgehend einer ebenfalls stark belastenden Operation ausgesetzt. Hiermit verbundene Folgen/ Komplikationen wie z.B. Infektionen konnten in der Studie nicht verifiziert und somit berücksichtigt werden. Ein Teil der Versuche wurde mit C57BL/6 Wildtypmäusen durchgeführt, der andere Teil mit genetisch veränderten, nämlich CD26 KO Tieren. Berücksichtigt werden muss hierbei, dass jegliche genetische Manipulation auch zu Veränderungen im gesamten Organismus, bzw. einzelner Teile führen kann, auch wenn die verwendeten Tiere anatomisch keinerlei Unterschiede zeigten.

In Hinblick auf die Planung klinischer Studien sind weiterführende Untersuchungen bezüglich der pharmakologischen Hemmung von CD26 unerlässlich. Diesbezüglich wurden in unserer Forschungsgruppe bereits Experimente mit Diprotin A durchgeführt, die Tendenz entsprach weitgehend den Ergebnissen dieser Arbeit. Aktuell wurde von Zhang D. et al ebenfalls eine Arbeit veröffentlicht in der eine bessere myokardiale Funktion des infarzierten Mäuseherz nach Diprotin A Gabe postuliert wird (128).

Die durchgeführten Untersuchungen bezogen sich auf zwei verschiedene Botenstoffe, G-CSF und CD26, deren Wirkung zwar schon teilweise aber noch lange nicht gänzlich entschlüsselt werden konnte. Die Mitwirkung weiterer Faktoren an der Kaskade der Stammzellmobilisation und des –homings speziell am Myokard ist sicherlich anzunehmen und muss in der Zukunft noch weiter erforscht werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die koronare Herzkrankheit (KHK) und der hieraus resultierende Myokardinfarkt führen bereits seit mehreren Jahren die Statistik der Todesursachen in Europa an. Nach Ausschöpfung der präventiven Maßnahmen, rückt der Fokus der Forschung somit mehr und mehr auf Möglichkeiten der kardialen Regeneration „post eventum“ mittels Stammzelltherapie. Bereits seit längerem etabliert und in klinischer Testung ist hier der Granulozyten - Kolonie - stimulierende Faktor (G-CSF), der bei Mäusen angewendet durch Mobilisierung von Stammzellen in das infarzierte Herzgewebe zu einer verbesserten Herzfunktion und längerer Überlebenszeit führte. Als wichtige Komponente beim Homing von adulten Stammzellen konnte des Weiteren der Stromal-Cell-Derived-Factors (SDF1/ CXCR4) identifiziert werden, der durch die Ektopeptidase Dipeptidylpeptidase IV (CD26) inaktiviert wird. Nach Hemmung von CD26, welches klinisch bis dato hauptsächlich Bedeutung bei der Diabetes-Therapie hat, konnte ein vermehrtes *Homing* von Stammzellen aus dem peripheren Blut in das Knochenmark festgestellt werden. Als wichtiger Signalweg der G-CSF-abhängigen Mobilisierung wird ebenfalls die Unterbrechung der SDF-1/CXCR4 Kaskade vermutet, der genaue Mechanismus konnte jedoch noch nicht verifiziert werden. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, bei akutem Myokardinfarkt (mittels LAD-Ligation) am Mausmodell mit genetischem CD26 „*Knock out*“ die Kombination der beiden stammzelltherapeutischen Therapieansätze hinsichtlich Überleben, Herzfunktion, Remodelling und Stammzellwanderung in das Knochenmark, periphere Blut und Herzgewebe zu untersuchen. Die Gabe von G-CSF bei CD 26 $-/-$ Tieren führte zu einer signifikant besseren Überlebensrate ($> 20\%$) nach 30 Tagen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Des Weiteren konnte nach einem Monat eine geringere Infarktgröße bei den G-CSF behandelten Tieren und bei den genetisch veränderten, mit G-CSF behandelten Mäusen außerdem eine signifikant größere Dicke des linken Ventrikels, sowie eine gesteigerte Angiogenese (gemessen an der Zahl der Kapillaren mit CD31 positiven Zellen) festgestellt werden. Untersuchungen bezüglich der Herzfunktion, bezogen auf die Parameter Herz-Minuten-Volumen, endsystolischer Druck, Auswurffraktion und enddiastolisches Volumen zeigten signifikant positive Ergebnisse. Mittels Durchflusszytometrie wurde des weiteren die Mobilisationsrate von Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut bestimmt, auch hier konnten signifikant höhere Werte bei den mit G-CSF therapierten

Gruppen gemessen werden, was die These der Mitbeteiligung von CD26, an der G-CSF-abhängigen Mobilisationskaskade untermauert. Die Analyse des Herzgewebes ergab ein gesteigertes Homing von CD34+/CXCR4+ Progenitorzellen in das Herz mit Folge einer verbesserten Neoangiogenese und Zellproliferation unter Hemmung von CD26 und G-CSF-Gabe. In Hinblick auf die erhobenen Daten, ist wohl der Synergismus zwischen G-CSF Behandlung und Inhibition von CD26 der Schlüssel zur Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt, die genauen Mechanismen sind im weiteren Verlauf zu klären und hinsichtlich einer möglichen zukünftigen Anwendung beim Menschen, weitere Versuchsreihen mit medikamentöser Hemmung der Dipeptidylpeptidase IV in Kombination mit G-CSF-Gabe, durchzuführen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Statistisches Bundesamt, Pressemitteilung Nr.354 vom 23.09.2011
2. **Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH** *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes* (2). N Engl J Med (1992); 326(5):310-8.
3. **Weintraub WS, Harrison DG** *C-reactive protein, inflammation and atherosclerosis: do we really understand it yet?* Eur Heart J (2000);21(12):958-60.
4. **Stary HC** *Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis.* Am J Clin Nutr (2000);72 :1297S-306S.
5. **Stary HC** *Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults.* Arteriosclerosis (1989) 9:1 19-32.
6. **Stary HC** *The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life.* Eur Heart J (1990) 11 E:3-19.
- 6a. www.herzverband-tirol.at/.../herzinfarkt.jpg
7. **Pfeffer MA, Braunwald E**, *Ventricular enlargement following infarction is a modifiable process.* Am J Cardiol. (1991) 68(14): 127D-131D.
- 7a. de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/792800
8. **Kelm M, Strauer BE** *Interventional therapy of the acute cardiac infarct.* Internist (Berl) (2001) 42(5):686-98.
9. Deutsche Stiftung Organspendetransplantation Jahresbericht 2007
10. **Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L** *Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes.* J Clin Invest (2001) 108(3):407-14.
11. **Nir SG, David R, Zaruba M, Franz WM, Itskovitz-Eldor J.** *Human embryonic stem cells for cardiovascular repair.* Cardiovasc Res (2003) 58(2):313-23.
12. **Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM** *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.* Science (1998) 282 (5391):1145-7
13. **Passier R, Mummery C** *Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair.* Cardivasc Res. (2003) 58: 324–35

14. **Embryonenschutzgesetz** vom 13. Dezember 1990 (BGBl. I S. 2746), das durch Artikel 22 des Gesetzes vom 23. Oktober 2001 (BGBl. I S. 2702) geändert worden ist.
15. **Tagesschau:** *Bundestag lockert Stammzellgesetz* vom 11. April 2008.
16. **Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD** *Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair.* J Clin Invest (2005) 115(3):572-83.
17. **Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC** *Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo.* J Exp Med. (1996) 183(4):1797-806.
18. **Pittenger MF, Martin BJ** *Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics.* Circ Res. (2004) 95(1):9-20
19. **Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM** *Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain.* Exp Hematol. (2002) 30(8):896-904
20. **Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Müller HW, Zanjani E, Wernet P** *A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential.* J Exp Med. (2004) 200(2):123-35
21. **Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD** *Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis.* J Clin Invest. (1996) 98(11):2512-23.
22. **Hutcheson KA, Atkins BZ, Hueman MT, Hopkins MB, Glower DD, Taylor DA** *Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts.* Cell Transplant (2000) 9(3):359-68
23. **Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P** *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration.* Cell (2003) 114(6):763-76.
24. **Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA** *Regeneration of ischemic*

- cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. J Clin Invest.* (2001) 107(11):1395-402
25. **Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM** *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science* (1997) 275(5302):964-7.
 26. **Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath LR, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP** *Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. Blood* (1998) 92(2):362-7.
 27. **Beltrami AP, barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P** *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell* (2003) 114(6):763-76
 28. **Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD** *Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100(21):12313-8.
 29. **Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A** *Isolation and expansion of adult cardiac stemcells from human and murine heart. Circ Res.* (2004) 95(9):911-21
 30. **Tateishi K**, *Single Cardiac Stem Cells from Adult Mammalian Heart Are Pluripotent and Can Regenerate Ischemic Myocardium. American Heart Association; Scientific Sessions* (2005); Abstract 331.
 31. **Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S, Chien KR** *Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. Nature* (2005) 433(7026):647-53.
 32. **Goumans MJ**, *Human Cardiac Progenitor Cells are Able to Differentiate into Cardiomyocytes in Vitro. American Heart Association; Scientific Sessions* (2005):Abstract 337.
 33. **Van Vliet P, Sluijter JP, Doevendans PA, Goumans MJ** *Isolation and expansion of resident cardiac progenitor cells. Expert Rev Cardiovasc Ther.* (2007) 5(1):33-43.

34. **Menasche P** *Skeletal myoblast for cell therapy*. Coron Artery Dis.(2005) 16(2):105-10
35. **Engelmann MG, Franz WM** *Stem cell therapy after myocardial infarction: ready for clinical application?* Curr Opin Mol Ther. (2006) 8(5):396-414
36. **Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S** *Neovascularisation of ischemic myocardium by human bone-marrow- derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function*. Nat Med. (2001) 7:430–6.
37. **Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P** *Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice*. Ann NY Acad Sci. (2001) 938: 221–9
38. **Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P** *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. Pediatr Transplant (2003) 7: 86–8
39. **Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD** *Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells*. Proc Natl Acad Sci USA (1998) 95: 13726–31
40. **Hamano K, Nishida M, Hirata K, Mikamo A, Li TS, Harada M, Miura T, Matsuzaki M, Esato K** *Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease – clinical trial and preliminary results*. Jpn Circ J. (2001) 65: 845–7
41. **Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P** *Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans*. Circulation (2002) 106(15):1913-8.
42. **Assmus B, Honold J, Schächinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM** *Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction*. N Engl J Med. (2006) 355(12):1222-32
43. **Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, Fernandez ME, Penarrubia MJ, de la Fuente L, Gomez-Bueno M, Cantalapiedra A, Fernandez J, Gutierrez O, Sanchez PL, Hernandez C, Sanz R, Garcia-**

- Sancho J, Sanchez A** *Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction.* Circ Res. (2004) 95(7):742-8
44. **Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebekk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Groggaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Müller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K** *Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction.* N Engl J Med. (2006) 355(12):1199-209.
45. **Schachinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschemann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM** *Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction.* N Engl J Med. (2006) 355(12):1210-21
46. **Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM** *Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial.* J Am Coll Cardiol. (2004) 44(8):1690-9
47. **Britten M**, *Preserved Functional Improvement and Evidence for Reverse Left Ventricular Remodelling 2 Years after Intracoronary Progenitor Cell Therapy in Patients with Acute Myocardial Infarction.* American Heart Association; Scientific Sessions (2005): Abstract 2985.
48. **Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F** *Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial.* Lancet (2006) 367(9505):113-21
49. **Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H** *Intracoronary autologous bone-marrow*

- celltransfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. Lancet (2004) 364(9429):141-8*
- 49a In Kooperation mit **Huber, Bruno** *Einfluss von Parathormon auf Stammzellmobilisation und kardiales Remodelling nach akutem Myokardinfarkt im Mausmodell* Dissertation Medizin (2007)
- 50.**Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, Grünwald F, Aicher A, Urbrich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM** *Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI).* Circulation (2002) 106(24):3009-17
- 51.**Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schächinger V, Dimmeler S, Zeiher AM** *Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCAREAMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging.* Circulation (2003) 108(18):2212-8
- 52.**Lunde K, Solheim S, aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Forfang K** *Autologous stemcell transplantation in acute myocardial infarction: The ASTAMI randomized controlled trial. Intracoronary transplantation of autologous mononuclear bone marrow cells, study design and safety aspects.* Scand Cardiovasc J. (2005) 39(3):150-8.
- 53.**Schächinger V** *REPAIR-AMI: Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodelling in Acute Myocardial Infarction.* Medscape (2005)
- 54.**Wollert KC, Drexler H,** *Clinical applications of stem cells for the heart.* Circ Res. (2005) 96(2):151-63.
- 55.**Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T** *Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization.* Nat Med. (1999) 5(4):434-8
- 56.**Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM** *VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells.* Embo J. (1999) 18(14):3964-72

57. **Vandervelde S, van Luyn MJ, Tio RA, Harmsen MC** *Signaling factors in stem cell mediated repair of infarcted myocardium.* J Mol Cell Cardiol. (2005) 39(2):363-76
58. **Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S** *Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization.* Blood (2003) 102(4):1340-6
59. **Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Taneo M, Shieh JH, Hackett NR, Quitoriano MS, Crystal RG, Rafii S, Moore MA** *Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells.* Blood (2001) 97(11):3354-60
60. **Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ** *Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide.* J Clin Invest. (2003) 111(2):187-96
61. **Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, Short B, Simmons PJ, Winkler I, Levesque JP, Chappel J, Ross FP, Link DC** *G-CSF potentially inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow.* Blood (2005) 106(9):3020-7
62. **Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, Isner JM, Asahara T, Losordo DW** *Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury.* Circulation (2003) 108(25):3115-21
63. **Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rütten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM** *HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway.* J Clin Invest. (2001) 108(3):391-7
64. **Winkler IG, Levesque JP** *Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization: when innate immunity assails the cells that make blood and bone.* Exp Hematol. (2006) 34(8):996-1009
65. **Laufs U, Werner N, Links A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Mische E, Böhm M, Nickenig G** *Physical training increases endothelial progenitor cells,*

- inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. Circulation* (2004) 109(2):220-6
66. **Basu S, Dunn A, Ward A** *G-CSF: function and modes of action (Review). Int J Mol Med.* (2002) 10(1): 3-10
 67. **Kawakami M, Tsutsumi H, Kumakawa T, Abe H, Hirai M, Kurosawa S, Mori M, Fukushima M** *Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. Blood* (1990) 76 (10):1962-4
 68. **Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, Majka M, Kucia M, Maslankiewicz K, Wyderka R, Ochala A, Ratajczak MZ** *Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. Circulation* (2004) 110(20) 3213-20
 69. **Leone AM, Rutella S, Bonanno G, Contemi AM, de Ritis DG, Giannico MB, Rebuzzi AG, Leone G, Crea F** *Endogenous G-CSF and CD34(+) cell mobilization after acute myocardial infarction. Int J Cardiol* (2006) 111(2):2002-8
 70. **Basu S, Hodgson G, Katz M, Dunn AR** *Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. Blood* (2002) 100(3): 854-61
 71. **Roberts AW**, *G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! Growth Factors.* (2005) 23(1): 33-41
 72. **Bussolino F, Wang JM, Defilippi P, Turrini F, Sanavio F, Edgell CJ, Aglietta M, Arese P, Mantovani A** *Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. Nature* (1989) 337(6206):471-3
 73. **Lee JB, Lee JE, Park JH, Kim SJ, Kim MK, Roh SI, Yoon HS** *Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition. Biol Reprod.* (2005) 72(1):42-9
 74. **Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, Ohtsuka M, Matsuura K, Sano M, Nishi J, Iwanaga K, Akazawa H, Kunieda T, Zhu W, Hasegawa H, Kunisada K, Nagai T, Nakaya H, Yamauchi-Takahara K, Komuro I** *G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. Nat Med* (2005) 11(3):305-

75. **Bronchud MH, Potter MR, Morgenstern G, Blasco MJ, Scarffe JH, Thatcher N, Crowther D, Souza LM, Alton NK, Testa NG** *In vitro and in vivo analysis of the effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients.* Br. J. Cancer. (1988) 58 (1):64-9
76. **Lord BI, Bronchud MH, Owens S, Chang J, Howell A, Souza L, Dexter TM** *The kinetics of human granulopoiesis following treatment with granulocyte colony-stimulating factor in vivo.* Proc Natl Acad Sci USA. (1989) 86 (23) : 9499-503
77. **Pitrak DL** *Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the bactericidal functions of neutrophils.* Curr Opin Hematol. (1997) 4 (3) : 183-90
78. **Höglund M, Hakansson L, Venge P** *Effects of in vivo administration of G-CSF on neutrophil functions in healthy volunteers.* Eur J Haematol. (1997) 58 (3) : 195-202
79. **Leavey PJ, Thurman G, Ambruso DR** *Functional characteristics of neutrophils collected and stored after administration of G-CSF.* Transfusion (2000) 40(4) : 414-9
80. **Papayannopoulou T** *Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization.* Blood. (2004) 103(5): 1580-5
81. **Pruijt JF, Fibbe WE, Laterveer L, Pieters RA, Lindley IJ, Paemen L, Masure S, Willemze R, Opdenakker G** *Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the metalloproteinase gelatinase B (MMP-9).* Proc Natl Acad Sci U S A (1999) 96(19):10863-8
82. **Fibbe WE, Pruijt JF, van Kooyk Y, Figdor CG, Opdenakker G, Willemze R** *The role of metalloproteinases and adhesion molecules in interleukin-8-induced stem-cell mobilization.* Semin Hematol. (2000) 37(1 Suppl 2):19-24
83. **Robinson SN, Pisarev VM, Chavez JM, Singh RK, Talmadge JE** *Use of matrix metalloproteinase (MMP)-9 knockout mice demonstrates that MMP-9 activity is not absolutely required for G-CSF or Flt-3 ligand-induced hematopoietic progenitor cell mobilization or engraftment.* Stem Cells. (2003) 21(4):417-27
84. **Pelus LM, Bian H, King AG, Fukuda S** *Neutrophil-derived MMP-9 mediates synergistic mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells by the*

- combination of G-CSF and the chemokines GRObeta/CXCL2 and GRObetaT/CXCL2delta4. Blood (2004) 103(1):110-9*
85. **Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T** *G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. Nat Immunol. (2002) 3(7):687-94*
 86. **Deutsches Ärzteblatt** Jg. 104 Heft 23 (2007)
 87. **Möhle R, Bautz F, Denzlinger C, Kanz L** *Transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells. Role of chemotactic factors. Ann. N Y Acad Sci. (2001) 938 : 26-34*
 88. **Mazo IB, Gutierrez-Ramos JC, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, von Adrian UH** *Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels : parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1 J. Exp Med. (1998) 188(3) : 465-74*
 89. **Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, Slav MM, Nagler A, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T** *The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34 (+) cells : role in transendothelial/ stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. Blood (2000) 95(11) : 3289-96*
 90. **Bautz F, Denzlinger C, Kanz L, Möhle R** *Chemotaxis and transendothelial migration of CD34 (+) hematopoietic progenitor cells induced by the inflammatory mediator leukotriene D4 are mediated by the 7-transmembrane receptor CysLT1. Blood (2001) 97(11) 3433-40*
 91. **Boehmler AM, Denzlinger C, Kanz L, Möhle R** *Potential role of cysteinyl leukotrienes in trafficking and survival of hematopoietic progenitor cells. Adv Exp Med Biol. (2003) 525 : 25-8*
 92. **Kimura T, Boehmler AM, Seitz G, Kuci S, Wiesner T, Brinkmann V, Kanz L, Möhle R** *The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 supports CXCR4-dependent migration an bone marrow homing of human CD34 (+) progenitor cells. Blood (2004) 103(12) : 4478-86*
 93. **Seitz G, Boehmler AM, Kanz L, Möhle R** *The role of sphingosine 1-phosphat receptors in the trafficking of hematopoietic progenitor cells. Ann N Y Acad. Sci. (2005) 1044 : 84-9*

94. **Hopsu-Havu VK, Glenner GG** *A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide.* Histochemie (1966) 7(3) : 197-201
95. **Marguet D, Bernard AM, Vivier I, Darmoul D, Naquet P, Pierres M** *cDNA cloning for mouse thymocyte-activating molecule. A multifunctional ecto-dipeptidyl peptidase IV (CD26) included in a subgroup of serine proteases.* J. Biol Chem. (1992) 267(4) : 2200-8
96. **Rawlings ND, Barrett AJ** *Families of cystein peptidases.* Methods Enzymol. (1994) 244 : 461-86
97. **Abbott CA, McCaughan GW, Gorrell MD** *Two highly conserved glutamic ACCd residues in the predicted beta propeller domain of dipeptidyl peptidase IV are required for its enzyme activity.* FEBS Lett. (1999) 458(3) : 278-84
98. **Camargo AC, Caldo H, Reis ML** *Susceptibility of a peptide derived from bradykinin to hydrolysis by brain endo-oligopeptidases and pancreatic proteinases.* J Biol Chem. (1979) 254(12):5304–7
99. **Pacaud M, Richaud C** *Protease II from Escherichia coli. Purification and characterization.* J Biol Chem. (1975) 250(19):7771–9
100. **Mitta M, Asada K, Uchimura Y, Kimizuka F, Kato I, Sakiyama F, Tsunasawa S** *The primary structure of porcine liver acylamino ACCd-releasing enzyme deduced from cDNA sequences.* J Biochem. (1989) 106(4):548–51
101. **Yoshimoto T, Tsuru D** *Proline-specific dipeptidyl aminopeptidase from Flavobacterium meningosepticum.* J Biochem. (1982) 91(6) : 1899-906
102. **Bordallo C, Schwencke J, Suarez Rendueles M** *Localization of the thermosensitive X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase in the vacuolar membrane of Saccharomyces cerevisiae.* FEBS Lett. (1984) 173(1) : 199-203
103. **Kreil G, Haiml L, Suchanek G** *Stepwise cleavage of the pro part of promelittin by dipeptidylpeptidase IV. Evidence for a new type of precursor-product conversion.* Eur J Biochem. (1980) 111(1) : 49-58
104. **Kenny A, Booth AG, George SG, Ingram J, Kershaw D, Wood EJ, Young AR** *Dipeptidyl peptidase IV, a kidney brush-border serine protease.* Biochem J. (1976) 157(1):169-82
105. **Püschel G, Mentlein R, Heymann E** *Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta.* Eur J Biochem. (1982) 126(2) : 359-65

106. **Ikehara Y, Ogata S, Misumi Y** *Dipeptidyl-peptidase IV from rat liver*. Methods Enzymol. (1994) 244 : 215-27
107. **Darmoul D, Voisin T, Couvineau A, Rouyer-Fessard C, Salomon R, Wang Y, Swallow DM, Laburthe M** *Regional expression of epithelial dipeptidyl peptidase IV in the human intestines*. Biochem Biophys Res Commun. (1994) 203(2) : 1224-9
108. **Chikuma T, Hama T, Nagatsu T, Kumegawa M, Kato T** *Purification and properties of dipeptidyl peptidase IV from human urine*. Biol Chem Hoppe Seyler. (1990) 371(4) : 325-30
109. **Hino M, Nagatsu T, Kakumu S, Okuyama S, Yoshii Y, Nagatsu I** *Glycylprolyl beta-naphthylamidase activity in human serum*. Clin Chim Acta. (1975) 62(1) : 5-11
110. **Kreisel W, Volk BA, Büchsel R, Reutter W** *Different half-lives of the carbohydrate and protein moieties of a 110,000-dalton glycoprotein isolated from plasma membranes of rat liver*. Proc Natl Acad Sci USA. (1980) 77(4) : 1828-31
111. **Volk BA, Kreisel W, Köttgen E, Gerok W, Reutter W** *Heterogeneous turnover of terminal and core sugars within the carbohydrate chain of dipeptidylaminopeptidase IV isolated from rat liver plasma*. FEBS Lett. (1983) 163(1) : 150-2
112. **Darmoul D, Lacasa M, Baricault L, Marquet D, Sapin C, Trotot P, Barbat A, Trugnan G** *Dipeptidyl peptidase IV (CD26) gene expression in enterocyte-like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2. Cloning of the complete human coding sequence and changes of dipeptidyl peptidase IV mRNA levels during cell differentiation*. J Biol Chem. (1992) 167(7) : 4824-33
113. **Hong WJ, Doyle D** *Molecular dissection of the NH₂-terminal signal/anchor sequence of rat dipeptidyl peptidase IV*. J Cell Biol. (1990) 111(2):323-8
114. **Wolf B, Fischer G, Barth A** *Kinetics of dipeptidyl-peptidase IV*. Acta Biol Med Ger. (1978) 37(3):409-20
115. **Kähne T, Kröning H, Thiel U, Ulmer AJ, Flad HD, Ansorge S** *Alterations in structure and cellular localization of molecular forms of DP IV/CD26 during T cell activation*. Cell Immunol. (1996) 170(1):63-70
116. **Tanaka T, Camerini D, Seed B, Torimoto Y, Dang NH, Kameoka J, Dahlberg HN, Schlossman SF, Morimoto C** *Cloning and functional*

- expression of the T cell activation antigen CD26. J. Immunol. (1992) 149(2): 481–6*
117. **Fan H, Meng W, Kilian C, Grams S, Reutter W** *Domain-specific N-glycosylation of the membrane glycoprotein dipeptidylpeptidase IV (CD26) influences its subcellular trafficking, biological stability, enzyme activity and protein folding. Eur J Biochem. (1997) 246(1):243-51*
 118. **Iwaki-Egawa S, Watanabe Y, Kikuya Y, Fujimoto Y** *Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. J Biochem. (1998) 124(2):428-33*
 119. **Vanhoof G, De Meester I, van Sande M, Scharpe S, Yaron A** *Distribution of proline-specific aminopeptidases in human tissues and body fluids. Eur J Clin Chem Clin Biochem. (1992) 30(6):333-8*
 120. **Mentlein R** *Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. Regul Pept. (1999) 85(1):9-24*
 121. **Hiramatsu H, Kyono K, Higashiyama Y, Fukushima C, Shima H, Sugiyama S, Inaka K, Yamamoto A, Shimizu R** *The structure and function of human dipeptidyl peptidase IV, possessing a unique eight-bladed beta-propeller fold. Biochem Biophys Res Commun. (2003) 302(4):849-54*
 122. **Gorrell MD** *Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. Clin Sci (Lond). (2005) 108(4):277-92*
 123. **Rasmussen HB, Branner S, Wiberg FC, Wagtmann N** *Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV/CD26 in complex with a substrate analog. Nat Struct Biol. (2003) 10(1):19-25*
 124. **Heiduschka P, Dittrich J, Heins J, Neubert K, Barth A** *Application of dipeptidylpeptidase IV in formation of the peptide bond. Pharmazie. (1989) 44(11):778-80*
 125. **Wrenger S, Hoffmann T, Faust J, Mrestani-Klaus C, Brandt W, Neubert K, Kraft M, Olek S, Frank R, Ansorge S, Reinhold D** *The N-terminal structure of HIV-1 Tat is required for suppression of CD26-dependent T cell growth. J Biol Chem. (1997) 272(48):30283-8*
 126. **Wrenger S, Faust J, Mrestani-Klaus C, Fengler A, Stockel-Maschek A, Lorey S, Kahne T, Brandt W, Neubert K, Ansorge S, Reinhold D** *Down-regulation of T cell activation following inhibition of dipeptidyl peptidase*

- IV/CD26 by the N-terminal part of the thromboxane A2 receptor. J Biol Chem.* (2000) 275(29):22180-6
127. **Umezawa H, Aoyagi T, Ogawa K, Naganawa H, Hamada M, Takeuchi T** *Diprotins A and B, inhibitors of dipeptidyl aminopeptidase IV, produced by bacteria. J Antibiot (Tokyo) (1984) 37(4):422-5*
 128. **Rahfeld J, Schierhorn M, Hartrodt B, Neubert K, Heins J** *Are diprotin A (Ile-Pro-Ile) and diprotin B (Val-Pro-Leu) inhibitors or substrates of dipeptidyl peptidase IV? Biochim Biophys Acta. (1991) 1076(2):314-6*
 129. **Schön E, Born I, Demuth HU, Faust J, Neubert K, Steinmetzer T, Barth A, Ansorge S** *Dipeptidyl peptidase IV in the immune system. Effects of specific enzyme inhibitors on activity of dipeptidyl peptidase IV and proliferation of human lymphocytes. Biol Chem Hoppe Seyler. (1991) 372(5):305-11*
 130. **Gutheil WG, Bachovchin WW** *Separation of L-Pro-DL-boroPro into its component diastereomers and kinetic analysis of their inhibition of dipeptidyl peptidase IV. A new method for the analysis of slow, tight-binding inhibition. Biochemistry. (1993) 32(34):8723-31*
 131. **Pargellis CA, Campbell SJ, Pav S, Graham ET, Pitner TP** *Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (CD26) by peptide boronic ACCd dipeptides. J Enzyme Inhib. (1997) 11(3):151-69*
 132. **Oleksyszyn J, Powers JC** *Amino ACCd and peptide phosphonate derivatives as specific inhibitors of serine peptidases. Methods Enzymol. (1994) 244:423-41*
 133. **Boduszek B, Oleksyszyn J, Kam CM, Selzler J, Smith RE, Powers JC** *Dipeptide phosphonates as inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. J Med Chem. (1994) 37(23):3969-76*
 134. **Stöckel A, Stiebitz B, Neubert K** *Specific inhibitors of aminopeptidase P. Peptides and pseudopeptides of 2-hydroxy-3-amino ACCds. Adv Exp Med Biol. (1997) 421:31-5*
 135. **Lambeir AM, Borloo M, De Meester I, Belyaev A, Augustyns K, Hendriks D, Scharpe S, Haemers A** *Dipeptide-derived diphenyl phosphonate esters: mechanism-based inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. Biochim Biophys Acta. (1996) 1290(1):76-82*

136. **De Meester I, Belyaev A, Lambeir AM, De Meyer GR, Van Osselaer N, Haemers A, Scharpe S** *In vivo inhibition of dipeptidyl peptidase IV activity by pro-pro-diphenyl-phosphonate (Prodiptine)* Biochem Pharmacol.(1997) 54(1):173-9
137. **Mentlein R, Heymann E** *Liver dipeptidyl aminopeptidase IV hydrolyzes substance P.*, FEBS Lett. (1978) 91(2):360-4
138. **Kato T, Nagatsu T, Fukasawa K, Harada M, Nagatsu I, Sakakibara S** *Successive cleavage of N-terminal Arg1--Pro2 and Lys3-Pro4 from substance P but no release of Arg1-Pro2 from bradykinin, by X-Pro dipeptidyl-aminopeptidase.* Biochim Biophys Acta. (1978) 525(2):417-22
139. **Demuth HU, Heins J, Fujihara H, Mordy CW, Barth A, Schowen RL** *Molecular interactions in intermediate and transition states in the self-stimulated inhibition of enzymes* Pharmazie. (1988) 43(4):262-4
140. **Bongers J, Lambros T, Ahmad M, Heimer EP** *Kinetics of dipeptidyl peptidase IV proteolysis of growth hormone-releasing factor and analogs.* Biochim Biophys Acta. (1992) 1122(2):147-53
141. **Heins J, Neubert K, Barth A, Canizaro PC, Behal FJ** *Kinetic investigations of the hydrolysis of aminoacyl-p-nitroanilides by Dipeptidyl Peptidase IV from human and pig kidney.* Biochim Biophys Acta. (1984) 785 30-35
142. **Heins J, Welker P, Schönlein C, Born I, Hartrodt B, Neubert K, Tsuru D, Barth A** *Mechanism of proline-specific proteinases: (I) Substrate specificity of Dipeptidyl Peptidase IV from pig kidney and Proline Specific Endopeptidase from Flavobacterium meningosepticum.* Biochim Biophys Acta. (1988) 954 161-9
- 142a. **Demuth HU, Heins J** *Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) in Metabolism and the Immune Response.* B.Fleischer, Editor. Springer Verlag Heidelberg, 1-26. (1995)
143. **Mentlein R, Dahms P, Grandt D, Krüger R** *Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV.* Regul Pept. (1993) 49, 133-144
144. **Mentlein R**, *Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides.* Regul. Pept. (1999) 85(1): 9-24

145. **Ahmad S, Wang L, Ward PE** *Dipeptidyl(amino)peptidase IV and aminopeptidase M metabolize circulating substance P in vivo*. J. Pharmacol. Exp. Ther. (1992) 260 (3):1257-61
146. **Russel JS**, *Substance P and Neurokinin A metabolism by cultured human skeletal muscle myocytes and fibroblasts*. Peptides. (1996) 17:1397-1403
147. **Kikuchi M, Fukuyama K, Epstein WL** *Soluble dipeptidyl peptidase IV from terminal differentiated rat epidermal cells: purification and its activity on synthetic and natural peptides*. Arch Biochem Biophys. (1988) 266(2):369-76
148. **Sakaguchi M, Koseki M, Wakamatsu M, Matsumura E** *Effects of beta-casomorphin-5 on passive avoidance response in mice*. Biosci Biotechnol Biochem. (2003) 67(11):2501-4
149. **Shane R, Wilk S, Bodnar RJ** *Modulation of endomorphin-2-induced analgesia by dipeptidyl peptidase IV*. Brain Res. (1999) 815(2):278-86
150. **Bouras M, Huneau JF, Luengo C, Erlanson-Albertsson C, Tome D** *Metabolism of enterostatin in rat intestine, brain membranes, and serum: differential involvement of proline-specific peptidases*. Peptides. (1995) 16(3):399-405
151. **Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA** *Degradation of Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide and truncated Glucagon-Like Peptide-1 in vitro and in vivo by Dipeptidyl peptidase IV*. Endocrinology. (1995) 136 (8):3585-96
152. **Drucker DJ, Shi Q, Crivici A, Sumner-Smith M, Tavares W, Hill M, DeForest L, Cooper S, Brubaker PL** *Regulation of the biological activity of glucagon-like peptide 2 in vivo by dipeptidyl peptidase IV*. Nat Biotechnol. (1997) 15(7):673-7
153. **Lambeir AM, Proost P, Scharpe S, De Meester I** *A kinetic study of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2 truncation by dipeptidyl peptidase IV, in vitro*. Biochem Pharmacol. (2002) 64(12):1753-6
154. **Mentlein R, Heymann E** *Dipeptidyl peptidase IV inhibits the polymerization of fibrin monomers*. Arch Biochem Biophys. (1982) 217(2):748-50
155. **Siegel EG, Gallwitz B, Scharf G, Mentlein R, Morys-Wortmann C, Fölsch UR, Schrezenmeir J, Drescher K, Schmidt WE** *Biological activity of GLP-1-analogues with N-terminal modifications*. Regul. Pept (1999) 79(2-3): 93-102

156. **Yip RG, Wolfe MM** *GIP biology and fat metabolism*. Life Sci. (2000) 66: 91-103
157. **Oravecz T, Pall M, Roderiquez G, Gorrell MD, Ditto M, Nguyen NY, Boykins R, Unsworth E, Norcross MA** *Regulation of the receptor specificity and function of the chemokine Rantes (regulated on activation normal T cell expressed and secreted) by Dipeptidyl Peptidase IV (CD26)-mediated cleavage*. J Exp Med. (1997) 186(11):1865-72
158. **Proost P, De Meester I, Schols D, Struyf S, Lambeir AM, Wuyts A, Opdenakker G, De Clercq E, Scharpe S, Van Damme J** *Amino-terminal truncation of chemokines by CD26/dipeptidyl-peptidase IV. Conversion of RANTES into a potent inhibitor of monocyte chemotaxis and HIV-1-infection*. J Biol Chem. (1998) 273(13):7222-7
159. **De Meester I, Korom S, Van Damme J, Scharpe S** *CD26, let it cut or cut it down*. Immunol. Today (1999) 20(8): 367-375
160. **Kameoka J, Tanaka T, Nojima Y, Schlossman SF, Morimoto C** *Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26*. Science. (1993) 261(5120):466-9
161. **De Meester I, Vanham G, Kestens L, Vanhoof G, Bosmans E, Gigase P, Scharpe S** *Binding of adenosine deaminase to the lymphocyte surface via CD26*. Eur J Immunol. (1994) 24(3):566-70
162. **Franco R, Valenzuela A, Lluís C, Blanco J** *Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-Adenosine Desaminase in lymphocytes*. Immunol Rev. (1998) 161:27-42
163. **Dong RP, Kameoka J, Hegen M, Tanaka T, Xu Y, Schlossman SF, Morimoto C** *Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response*. J Immunol. (1996) 156(4):1349-55
164. **Hanski C, Huhle T, Gossrau R, Reutter W** *Direct evidence for the binding of rat liver DPP IV to collagen in vitro*. Exp Cell Res. (1988) 178(1):64-72
165. **Bauvois B** *A collagen-binding glycoprotein on the surface of mouse fibroblasts is identified as dipeptidyl peptidase IV*. Biochem J. (1988) 252(3):723-31

166. **Piazza GA, Callanan HM, Mowery J, Hixson DC** *Evidence for a role of dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated interactions of hepatocytes with extracellular matrix.* Biochem J. (1989) 262(1):327-34
167. **Cheng HC, Abdel-Ghany M, Elble RC, Pauli BU** *Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin.* J Biol Chem. (1998) 273(37):24207-15
168. **Cheng HC, Abdel-Ghany M, Pauli BU** *A novel consensus motif in fibronectin mediates dipeptidyl peptidase IV adhesion and metastasis.* J Biol Chem. (2003) 278(27):24600-7
169. **Mentlein R, Heymann E, Scholz W, Feller AC, Flad HD** *Dipeptidyl peptidase IV as a new surface marker for a subpopulation of human T-lymphocytes.* Cell Immunol. (1984) 89(1):11-9
170. **Scholz W, Mentlein R, Heymann E, Feller AC, Ulmer AJ, Flad HD** *Interleukin 2 production by human T lymphocytes identified by antibodies to dipeptidyl peptidase IV.* Cell Immunol. (1985) 93(1):199-211
171. **Willheim M, Ebner C, Baier K, Kern W, Schratlbauer K, Thien R, Kraft D, Breiteneder H, Reinisch W, Scheiner O** *Cell surface characterization of T lymphocytes and allergen-specific T cell clones: correlation of CD26 expression with T (H1) subsets.* J Allergy Clin Immunol. (1997) 100(3):348-55
172. **Dang NH, Torimoto Y, Sugitta K, Daley JF, Schow P, Prado C, Schlossman SF, Morimoto C** *Cell surface modulation of CD26 by anti-1F7 monoclonal antibody. Analysis of surface expression and human T cell activation.* J Immunol. (1990) 145(12):3963-71
173. **Tanaka T, Duke-Cohan JS, Kameoka J, Yaron A, Lee I, Schlossman SF, Morimoto C** *Enhancement of antigen-induced T-cell proliferation by soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV.* Proc Natl Acad Sci U S A. (1994) 91(8):3082-6
174. **Korom S, De Meester I, Onodera K, Stadlbauer TH, Borloo M, Lambeir AM, Kupiec-Weglinski JW** *The effects of CD26/DPP IV-targeted therapy on acute allograft rejection.* Transplant Proc. (1997) 29(1-2):1274-5
175. **Stancíková M, Lojda Z, Lukac J, Ruzickova M** *Dipeptidyl peptidase IV in patients with systemic lupus erythematosus.* Clin Exp Rheumatol. (1992) 10(4):381-5

- 176.**Hagihara M, Fujiwara M, Nagatsu T** *Activities of dipeptidyl peptidases in BXSB mice and MRL/lpr mice with lupus erythematosus-like syndrome.* Biochem Med Metab Biol. (1989) 42(3):224-31
- 177.**Kamori M, Hagihara M, Nagatsu T, Miura T** *Activities of dipeptidyl peptidase II, dipeptidyl peptidase IV, prolyl endopeptidase, and collagenase-like peptidase in synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis.* Biochem Med Metab Biol. (1991) 45(2):154-60
- 178.**Jacotot E, Callebaut C, Blanco J, Riviere Y, Krust B, Hovanessian AG** *HIV envelope glycoprotein-induced cell killing by apoptosis is enhanced with increased expression of CD26 in CD4+ T cells.* Virology. (1996) 223(2):318-30
- 179.**Martinez-Navio JM, Climent N, Pacheco R, Garcia F, Plana M, Nomdedeu M, Oliva H, Rovira C, Miralles L, Gatell JM, Gallart T, Mallol J, Lluís C, Franco R** *Immunological dysfunction in HIV-1-infected individuals caused by impairment of adenosine deaminase-induced costimulation of T-cell activation.* Immunology. (2009) 128(3):393-404
- 180.**Drucker DJ** *Glucagon-like peptides.* Diabetes. (1998) 47(2):159-69
- 181.**Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ** *Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects.* Diabetes. (1995) 44(9):1126-31
- 182.**Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ** *Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidylpeptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine.* Endocrinology.(1999) 140:5356-63
- 183.**Deacon CF, Pridal L, Klarskov L, Olesen M, Holst JJ** *Glucagon-like peptide 1 undergoes differential tissue-specific metabolism in the anesthetized pig.* Am J Physiol. (1996) 271(3 Pt 1):E458-E64.
- 184.**Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ** *Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo.* J Clin Endocrinol Metab. (1995) 80:952-7
- 185.**Ahren B, Hughes TE** *Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 augments insulin secretin in response to exogenously administered glucagon-like peptide-1, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, pituitary adenylate cyclase-*

- activating polypeptide, and gastrin-releasing peptide in mice. Endocrinology.* (2005) 146:2055-9.
186. **Marguet D, Baggio L, Kobayashi T, Bernard AM, Pierres M, Nielsen PF, Ribel U, Watanabe T, Drucker DJ, Wagtmann N** *Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26.* Proc Natl Acad Sci U S A. (2000) 97(12):6874-9
 187. **Raz I, Hanefeld M, Xu L, Caria C, Williams-Herman D, Khatami H** *Efficacy and safety of the dipeptidylpeptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus.* Diabetologia. (2006) 49:2564-71
 188. **Pratley RE, Jauffret-Kamel S, Galbreath E, Holmes D** *Twelve-week monotherapy with the DPP-4 inhibitor vildagliptin improves glycemic control in subjects with type 2 diabetes.* Horm Metab Res. (2006) 38:423-8
 189. <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=4014>
 - 189a de. [wikipedia.org/wiki](http://www.wikipedia.org/wiki)
 190. **Broxmeyer HE, Kohli L, Kim CH, Lee Y, Mantel C, Cooper S, Hangoc G, Shaheen M, Li X, Clapp DW** *Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and G(alpha)i proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells.* J Leukoc Biol. (2003) 73(5):630-8
 191. **Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC** *The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood.* J Exp Med. (1997) 185(1):111-20
 192. **Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper, OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC** *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1.* Nat Med. (2004) 10(8):858-64
 193. **Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA** *A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)* J Exp Med. (1996) 184(3):1101-9
 194. **Burger JA, Burger M, Kipps TJ** *Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells.* Blood. (1999) 94(11):3658-67

195. **Möhle R, Bautz F, Rafii S, Moore MA, Brugger W, Kanz L** *The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1.* Blood. (1998) 91(12):4523-30
196. **Peled A, Grabovsky V, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Petit I, Ben-Hur H, Lapidot T, Alon R** *The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow.* J Clin Invest. (1999) 104(9):1199-211
197. **Hidalgo A, Sanz-Rodriguez F, Rodriguez-Fernandez JL, Albella B, Blaya C, Wright N, Cabanas C, Prosper F, Gutierrez-Ramos JC, Teixido J** *Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells.* Exp Hematol. (2001) 29(3):345-55
198. **Askari AT, Penn MS** *Stromal cell-derived factor-1 mediates stem cell homing and tissue regeneration.* Discov Med. (2003) 3(18):46-7
199. **Franz WM, Zaruba M, Theiss H, David R** *Stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy.* Lancet. (2003) 362(9385):675-6
200. **Christopherson KW, Hangoc G, Broxmeyer HE** *Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis of human cord blood CD34+ progenitor cells.* J Immunol. (2002) 169(12):7000-8
201. **Christopherson KW, Hangoc G, Mantel CR, Broxmeyer HE** *Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26.* Science. (2004) 305(5686):1000-3
202. **Segers VF, Tokunou T, Higgins LJ, MacGillivray C, Gannon J, Lee RT** *Local delivery of protease-resistant stromal cell derived factor-1 for stem cell recruitment after myocardial infarction.* Circulation. (2007) 116(15):1683-92
203. **Baerlocher G**, *Hämatologie: Verbessertes Homing von hämatopoietischen Stammzellen – oder: Darf es auch ein bisschen weniger sein?* Schweiz Med Forum (2005) 5:18–19
204. **Lapidot T, Petit I** *Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells.* Exp Hematol. (2002) 30: 973-81

205. **Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I, Kollet O, DiPersio JF, Link D, Devine S** *Stem cell mobilization*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. (2003) 419-37
- 205a. Grafik erstellt von Carl Göbel nach inhaltlichen Gesichtspunkten von 85, 200, 204 – 208. Modifiziert nach unbekanntem Urheber
206. **Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, Short B, Simmons PJ, Winkler I, Levesque JP, Chappel J, Ross FP, Link DC** *G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow*. Blood. (2005) 106(9):3020-7
207. **Christopherson KW, Cooper S, Broxmeyer HE** *Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells*. Blood. (2003) 101(12):4680-6
208. **Christopherson KW, Cooper S, Hangoc G, Broxmeyer HE** *CD26 is essential for normal G-CSF-induced progenitor cell mobilization as determined by CD26^{-/-} mice*. Exp Hematol. (2003) 31(11):1126-34
209. **Baan J, Jong TT, Kerkhof PL, Moene RJ, van Dijk AD, van der Velde ET, Koops J** *Continuous stroke volume and cardiac output from intra-ventricular dimensions obtained with impedance catheter*. Cardiovasc. Res. (1981) 15(6):328-34
210. **Coulter WH** *High speed automatic blood cell counter and cell size analyser*. Proc. Natl. Electron, conf. (1956) 12:1034-42
211. **Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P** *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival*. Proc Natl Acad Sci U S A. (2001) 98(18):10344-9
212. **Deindl E, Zaruba MM, Brunner S, Huber B, Mehl U, Assmann G, Hoefer IE, Mueller-Hoecker J, Franz WM** *G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis*. Faseb J. (2006) 20(7):956-8
213. **Avalos BR** *Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor*. Blood. (1996) 88(3):761-77
214. **Demetri GD, Griffin JD** *Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor*. Blood. (1991) 78(11):2791-808

215. **Hu X, Dai S, Wu WJ, Tan W, Zhu X, Mu J, Guo Y, Bolli R, Rokosh G** *Stromal cell derived factor-1 alpha confers protection against myocardial ischemia/reperfusion injury: role of the cardiac stromal cell derived factor-1 alpha CXCR4 axis.* Circulation. (2007) 116(6):654-63
216. **Gao XM, Xu Q, Kiriazis H, Dart AM, Du XJ** *Mouse model of post-infarct ventricular rupture: time course, strain- and gender-dependency, tensile strength, and histopathology.* Cardiovasc Res. (2005) 65(2):469-77
217. **Zhang Y, Adachi Y, Suzuki Y, Minamino K, Iwasaki M, Nakano K, Koike Y, Mukaide H, Shigematsu A, Kiriyaama N, Li C, Ikehara S** *Synergistic effects of granulocyte-colony stimulating factor and macrophage-colony stimulating factor on recovery of donor hematopoietic cells in allogeneic bone marrow transplantation.* Oncol Rep (2006) 16(2):367-71
218. **Ostronoff M, Ostronoff F, Souto Maior P, Matias C, Calixto R, Sucupira A, Domingues M, Florencio R, Tagliari C** *Pilot study of allogeneic G-CSF-stimulated bone marrow transplantation: harvest, engraftment, and graft-versus-host disease.* Biol Blood Marrow Transplant (2006) 12(7):729-33
219. **Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn MS** *Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy.* Lancet. (2003) 362(9385):697-703
220. **Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ** *Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury.* Circulation. (2004) 110(21):3300-5
221. **Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T** *Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization.* Proc Natl Acad Sci U S A (2000) 97: 3422-7
222. **Kocher A,** *Stammzellentherapie bei Herzerkrankungen: Status quo.* Kardiologie (2004) 11:259-68
223. **Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM** *Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model.* Am J Physiol (1995) 269(6 Pt 2):H2147-54

224. **Andersen HR, Nielsen TT, Rasmussen K, Thuesen L, Kelbaek H, Thayssen P, Abildgaard U, Pedersen F, Madsen JK, Grande P, Villadsen AB, Krusell LR, Haghfelt T, Lomholt P, Husted SE, Vigholt E, Kjaergard HK, Mortensen LS** *A comparison of coronary angioplasty with fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction.* N Engl J Med (2003) 349(8):733-42
225. **Bonnefoy E, Lapostolle F, Leizoorovicz A, Steg G, McFadden EP, Dubien PY; Cattan S, Boullenger E, Machecourt J, Lacroute JM, Cassagnes J, Dissait F, Touboul P** *Primary angioplasty versus prehospital fibrinolysis in acute myocardial infarction: a randomised study.* Lancet (2002) 360(9336):825-9
226. **Antithrombotic Trialists Collaboration** *Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients.* BMJ 2002; 324(7329):71- 86.
227. **Wienbergen H, Gitt AK, Senges J** *Actual clinical practice of guideline-recommended therapy of acute ST elevation myocardial infarction.* Herz (2005) 30(8):700-3
228. **Zhang D, Huang W, Dai B, Zhao T, Ashraf A, Millard RW, Ashraf M, Wang Y** *Genetically manipulated progenitor cell sheet with diproton A improves myocardial function and repair of infarcted hearts.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. (2010) 299(5):H1339-47
229. **Fadini GP, Boscaro E, Albiero M, Menegazzo L, Frison V, de Kreutzenberg S, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A** *The oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin increases circulating endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes: possible role of stromal-derived factor-1alpha.* Diabetes Care. (2010) 33(7):1607-9
230. **Zaruba MM, Theiss HD, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, Fischer R, Krieg L, Hirsch E, Huber B, Nathan P, Israel L, Imhof A, Herbach N, Assmann G, Wanke R, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G, Franz WM** *Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction.* Cell Stem Cell. (2009) 4(4):313-23
231. **Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrzkowski Z, Kowalska MA, Gewirtz AM, Emerson SG, Ratajczak MZ** *Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are*

secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. Blood (2001);97(10):3075-85

232.**Zaruba MM, Franz WM** *Role of the SDF-1-CXCR4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy. Expert Opin Biol Ther. (2010) 10(3):321-35*

233.**Loffredo FS, Steinhauser ML, Gannon J, Lee RT** *Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promote cardiac repair. Cell Stem Cell (2011) 8(4):389-398*

234.**Saxena A, Fish JE, White MD, Yu S, Smyth JW, Shaw RM, DiMaio JM, Srivastava D** *Stromal cell-derived factor-1alpha is cardioprotective after myocardial infarction. Circulation (2008) 117(17):2224-31*

235.**Smart N, Risebro CA, Melville AA, Moses K, Schwartz RJ, Chien KR, Riley PR** *Thymosin β 4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. Nature (2007) 445(7124): 177-182*

236.**Smart N, Bollini S, Dube KN, Vieira Jm, Zhou B, Davidson S, Yellon D, Riegler J, Price AN, Lythgoe MF, Pu WT, Riley PR** *De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. Nature (2011) 474(7353) 640-4*

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Arteria carotis interna
AKT	antiapoptotische Kinase
AS	Aminosäure
BMC	unfraktioniertes Knochenmark
BrdU	Bromodeoxyuridin
CD26	siehe DPP IV
CFU-G	Colony forming unit- Granulocyte
CSC	ortsständige kardiale Stammzelle
DPP IV	Dipeptidylpeptidase IV
EF	Ejektionsfraktion
EPC	endotheliale Progenitorzelle
EPO	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazellulär Signal-regulierte Proteinkinase
ESPVR	endsystolische Druck-Volumen-Beziehung
ES-Zelle	Embryonale Stammzelle
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
HIF-1	Hypoxie induzierbarer Faktor 1
HMV	Herzminutenvolumen
HPT	Hyperparathyreoidismus
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
HWZ	Halbwertszeit
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1

IGF-1	Insulin like Growth Factor 1
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Kontrolle
LAD	Left Anterior Descendens
LDL	Low-Density-Lipoproteine
LVA	Linksventrikuläre Angiographie
LVP	Linksventrikulärer Druck
MAPC	Multipotente adulte Progenitorzelle
MI	Myokardinfarkt
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale Stammzelle
PCI	Perkutane Koronarintervention
PE	Phycoerythin
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PerCP	Peridinin Chlorophyll-A-Protein
PTCA	Perkutane transluminale coronare Angioplastie
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormone-related Peptide
SCF	Stem cell factor
SDF-1	Stromal Cell Derived Factor 1
SPECT	Einzel-Photon-Emissions-Computertomographie
Tβ4	Thymosin β 4
USSC	Umbilikale somatische Stammzelle
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wt1	Wilms-tumor 1 gene

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik I des Klinikums Großhadern (Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck) in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. W. M. Franz im Rahmen des Promotionsstudienganges Molekulare Medizin (Stipendienprogramm FöFoLe) des Max-von-Pettenkofer-Instituts München durchgeführt.

Ich danke der gesamten FöFoLe Kommission unter dem Vorsitz von Herrn Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. Jürgen Heesemann für die Aufnahme in das Stipendienprogramm und die Möglichkeit mir Kenntnisse im Bereich des wissenschaftlichen Arbeitens und Forschens anzueignen, sowie das von mir gewählte Thema unter bestmöglichen Bedingungen zu bearbeiten.

Noch mehr möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. W. M. Franz bedanken, für die Aufnahme in sein Forschungsteam, die stete Unterstützung und den Glauben an mein Forschungsprojekt und mich. Sein gesamtes Team zeichnet sich nicht nur durch engagiertes, hochklassiges wissenschaftliches Arbeiten aus, sondern auch in hohem Masse durch ein sehr gutes Arbeitsklima und Harmonie auf zwischenmenschlicher Ebene! Ich habe mich die ganzen 5 Jahre sehr wohl und gut aufgehoben gefühlt, auch hierfür herzlichen Dank!

Meinem Betreuer in der Arbeitsgruppe Herrn Dr. med. Marc Michael Zaruba danke ich für die Hilfe bei der praktischen Durchführung der Arbeit, für seine Zeit, Geduld, sowie seine fachlichen Ratschläge und das gute Problemmanagement in unter Umständen auch stundenlangen Telefonaten...

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Bruno Huber für die Hilfe/Einweisung beim Erlernen der doch sehr komplexen Op-Technik und Herrn Dr. med. Stefan Brunner für die fachlichen Ratschläge und Hilfe insbesondere bei der FACS Analyse.

Frau Judith Arcifa danke ich für die optimale Unterstützung bei labortechnischen Arbeiten.

Für die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der histologischen Arbeiten danke ich Herrn Prof. Dr. med. J. Müller-Höcker und seinem Team.

Mein Dank gilt ebenfalls meinen Eltern, die mir das Medizinstudium und die Durchführung dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben, die mich immer wieder angetrieben und motiviert haben, gerade als es darum ging, die Arbeit neben dem Berufsleben endlich zu einem schriftlichen Ende zu bringen... Auch wenn unsere „wissenschaftlichen Diskussionen“ diesbezüglich nicht immer harmonisch abliefen, das Ergebnis spricht für sich...

Auch danke ich meiner Schwester und Ihren drei Männern für die „seelische“ Unterstützung größtenteils via Telefon, sowie M.M.M. für den mal mehr, mal weniger subtilen Ansporn -Nein, ich habe die Wette nicht vergessen - ...

Nicht zuletzt danke ich meiner guten Freundin und Mitdotorandin Fr. Monika Leiss, sie hat mir gezeigt, dass man, egal um was es geht, egal was kommen mag, niemals aufgeben darf im Leben!!!

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Ursula Agnes Mehl

Geburtstag und –ort: 17.09.1983 in München

Schulische Ausbildung

1993 – 2002 Ludwigsgymnasium, München : 06/2002 Abitur

Universitäre Ausbildung

10/2002– 9/2004 Vorklinik an der LMU München

09/2004 Ärztliche Vorprüfung

10/2004 – 05/2006 Teilnahme am Promotiosstudiengang Molekulare Medizin des Max-von-Pettenkofer-Instituts (Stipendienprogramm Förderung für Forschung und Lehre)

11/2008 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Hammerexamen)

Berufliche Laufbahn

12/2008 – 12/2009 Assistenzärztin in der Abteilung für Gefäßchirurgie am Klinikum Traunstein

Seit 12/2009 Assistenzärztin in Weiterbildung zur Fachärztin für Orthopädie und Unfallchirurgie in der Abteilung Unfall- Hand- und Wiederherstellungschirurgie am Klinikum Traunstein

Publikationen

Deindl E, Zaruba MM, Brunner S, Huber B, **Mehl U**, Assmann G, Hofer IE, Mueller-Hoecker J and Franz WM (2006). „*G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis.*“ FASEB J. 2006 May;20(7):956-8.

Zaruba MM, Theiss HD, Vallaster M, **Mehl U**, Brunner S, David R, Fischer R, Krieg L, Hirsch E, Huber B, Nathan P, Israel L, Imhof A, Herbach N, Assmann G, Wanke R, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G, Franz WM. „*Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction.*“ Cell Stem Cell. 2009 Apr 3;4(4):313-23.

